

Aus dem Institut für Gerontologie
der Universität Erlangen-Nürnberg und der
2. Medizinischen Klinik, Klinikum Nürnberg

Direktor: Professor Dr. D. Platt

Untersuchungen zur Phagozytose-Aktivität isoliert perfundierter Rattenlebern

Biochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen
zur Frage der altersabhängigen Erythrozytenphagozytose

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Klaus Hager
aus Selb

1984



Aus dem Institut für Gerontologie
der Universität Erlangen-Nürnberg und der
2. Medizinischen Klinik, Klinikum Nürnberg
Direktor: Professor Dr. D. Platt

Untersuchungen zur Phagozytose-Aktivität isoliert perfundierter Rattenlebern

Biochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen
zur Frage der altersabhängigen Erythrozytenphagozytose

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Klaus Hager
aus Selb

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf
Referent: Prof. Dr. D. Platt

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.1984

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1.	Leberperfusion	4
2.1.1.	Versuchstiere	4
2.1.2.	Operation	4
2.1.3.	Perfusionsapparatur	5
2.1.3.1	Aufbau	5
2.1.3.2	Beschreibung	8
2.1.4.	Durchführung der Leberperfusion	10
2.1.4.1	Vorbereitung der Apparatur	10
2.1.4.2	Betriebsart "offenes System"	11
2.1.4.3	Betriebsart "zyklisches System"	11
2.1.4.4	Präperfusion	11
2.1.4.5	Zyklische Perfusion	12
2.1.4.6	Reinigung und Wartung	12
2.1.5.	Perfusionsmedium	14
2.1.5.1	Grundlösung	14
2.1.5.2	Stammlösung	14
2.1.6.	Weitere Versuchskonstanten	15
2.1.7.	Messungen und Bestimmungen	15
2.1.7.1	Rattengewicht	15
2.1.7.2	Lebertrockengewicht	15
2.1.7.3	Flußrate	16
2.1.7.4	Plan der Probenaufarbeitung	16
2.1.8.	Gewinnung von Rattenerythrozyten	17
2.1.9.	Hämatologische Versuchsparameter	18
2.1.9.1	Hämoglobinbestimmung	18
2.1.9.2	Erythrozytenzählung	18
2.1.10.	Biochemische Kontrollparameter	18
2.1.10.1	Kaliumbestimmung	18
2.1.10.2	Enzymaktivitätsbestimmung von GOT und CPT	19
2.1.10.3	Enteiweißung	19
2.1.10.4	Glucosebestimmung	19
2.1.10.5	Lactat	20

	Seite
2.1.10.6	Pyruvat 21
2.1.10.7	Beta-Hydroxybutyrat 22
2.1.10.8	Acetoacetat 24
2.1.10.9	Elektronenmikroskopische Untersuchungen 25
2.2.	Trennung von Rattenerythrozyten 25
2.2.1.	Trennung nach PLATT et al. 25
2.2.2.	Trennung nach MURPHY 26
2.3.	Trennung von Rattenerythrozyten mit dem Elutriationsrotor 27
2.3.1.	Verwendete Geräte und Materialien 27
2.3.1.1	Aufbau der Elutriationsapparatur 27
2.3.1.2	Aufbau des Rotors JE-6 28
2.3.2.	Durchführung der Trennung von Rattenerythrozyten 28
2.3.2.1	Vorbereitung der Elutriationsapparatur 28
2.3.2.2	Elutriation 29
2.3.2.3	Prinzip der Trennung mit dem Elutriationsrotor 30
2.4.	Hämatologische Parameter der getrennten Erythrozyten 30
2.4.1.	Größe der Fraktionen 30
2.4.2.	Mittleres korpuskuläres Volumen (MCV) 30
2.4.3.	Mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH) 31
2.4.4.	Mittlere korpuskuläre Hämoglobin- konzentration (MCHC) 31
2.5.	N-Acetylneuraminsäure (NANA)-Bestimmung aus der Membran des Rattenerythrozyten 31
2.5.1.	N-Acetylneuraminsäure-Bestimmung 31
2.5.1.1	Reagenzien 31
2.5.1.2	Haltbarkeit der Lösungen 32
2.5.1.3	Durchführung der Bestimmung 32
2.5.1.4	Messung und Berechnung 32
2.5.2.	N-Acetylneuraminsäure-Bestimmung aus Rattenerythrozyten 33
2.5.2.1	Präparation von Membranen aus Rattenerythrozyten 33
2.5.2.2	Säurehydrolyse der Membranen 34
2.5.2.3	Neuraminsäure-Bestimmung 34

2.5.2.4	NANA-Bestimmung aus den Membranen aufgetrennter Erythrozyten	34
2.6.	Neuraminidasebehandlung und Plasma- inkubation von Rattenerythrozyten	35
2.6.1.	Neuraminidaseinkubation	35
2.6.2.	Berechnung der abgespalteten Menge an NANA pro Erythrozyt	35
2.6.3.	Plasmainkubation	36
2.6.3.1	Gewinnung von Rattenplasma	36
2.6.3.2	Plasmainkubation von Rattenerythrozyten	36
2.6.4.	Kontrollgruppe	37
2.7.	Statistische Auswertung	37
2.7.1.	Verwendete statistische Funktionen	37
2.7.2.	Signifikanztest	37
2.7.3.	Auswertung der Messwerte für das Gesamthämoglobin	39
2.8.	Versuchsplan	40
2.8.1.	Absicherung der Methoden	40
2.8.1.1	Hämoglobinfreie Leberperfusion (Serie I)	40
2.8.1.2	Leerperfusionen (Serie II und XVI)	40
2.8.1.3	Perfusion hämolysierter Erythrozyten (Serie III)	40
2.8.1.4	Perfusion mit autologen (Serie V) und homologen (Serie VI) Erythrozyten	40
2.8.1.5	Perfusion plasmainkubierter Ratten- erythrozyten (Serie VII)	42
2.8.2.	Perfusion von Erythrozyten unterschied- licher Herkunft	42
2.8.2.1	Perfusion menschlicher Erythrozyten (Serie XVII)	42
2.8.2.2	Perfusion autologer und homologer Rattenerythrozyten	42
2.8.3.	Alterierung in vitro	42
2.8.3.1	Perfusion hämolysierter Rattenerythrozyten (Serie III)	42
2.8.3.2	Perfusion glutaraldehydfixierter Ratten- erythrozyten (Serie IV)	42

2.8.3.3	Perfusion von Rattenerythrozyten nach Inkubation mit Neuraminidase (Serie VIII und IX)	42
2.8.4.	Alterung in vivo	42
2.8.4.1	Perfusionen von nach der Methode von MURPHY getrennten Rattenerythrozyten (Serie X, XI und XII)	43
2.8.4.2	Perfusionen von mit dem Elutriations- rotor getrennten Rattenerythrozyten (Serie XIII, XIV, XV)	43
3.	RESULTATE	44
3.1.	Biochemische Kontrollparameter	44
3.1.1.	Kalium	44
3.1.2.	Glucose	44
3.1.3.	GOT und GPT	48
3.1.4.	Lactat	49
3.1.5.	Pyruvat	51
3.1.6.	Beta-Hydroxybutyrat	52
3.1.7.	Acetoacetat	54
3.1.8.	Lactat/Pyruvat	57
3.1.9.	Beta-Hydroxybutyrat/Acetoacetat	58
3.1.10.	Änderungen der Glucose-, Pyruvat- und Lactatmengen im Perfusionsmedium	60
3.2.	Hämatologische Parameter	61
3.2.1.	Hämolyse	61
3.2.2.	Ablagerung	65
3.2.3.	Zusammenfassende Bewertung der hämatolo- gischen Parameter	65
3.2.4.	Graphische Darstellung der hämatologi- schen Parameter	66
3.3.	Weitere Versuchsparameter	67
3.3.1.	Lebertrockengewicht	67
3.3.2.	Flußrate des Perfusionsmediums	67
3.4.	Ergebnisse der Verfahren zur Dichte- trennung von Erythrozyten der Ratte	67
3.4.1.	Hämatologische Parameter der Fraktionen	67
3.4.2.	N-Acetylneuraminsäure-(NANA)gehalt der Fraktionen	69

	Seite
3.5.	Ergebnisse der Trennung mit dem Elutriationsrotor 72
3.6.	N-Acetylneuraminsäuregehalt von Rattenerythrozyten 73
3.6.1.	Abspaltbare NANA 73
3.6.2.	N-Acetylneuraminsäuregehalt verschiedener Präparationen perfundierter Erythrozyten 74
3.7.	Perfusionsversuche mit Erythrozyten 75
3.7.1.	Perfusionen zur Absicherung der Methoden 75
3.7.2.	Perfusionen mit verschiedenen Arten von Erythrozyten 76
3.7.2.1	Menschliche Erythrozyten 76
3.7.2.2	Autologe Rattenerythrozyten 78
3.7.2.3	Homologe Rattenerythrozyten 81
3.7.3.	Versuche mit alterierten Erythrozyten 83
3.7.3.1	Hämolysierte Erythrozyten 83
3.7.3.2	Glutaraldehydfixierte Rattenerythrozyten 84
3.7.3.3	Erythrozyten nach enzymatischer Abspal- tung von NANA 88
3.7.4.	Versuche mit in vivo gealterten Erythro- zyten 90
3.7.4.1	Trennung von Erythrozyten mittels Dichte- zentrifugation 90
3.7.4.2	Trennung von Erythrozyten mit dem Elutriationsrotor 93
3.8.	Kinetik der Phagozytose von Erythrozyten 95
4.	DISKUSSION 98
4.1.	Das Modell der isoliert perfundierten Rattenleber 98
4.2.	Die isoliert perfundierte Rattenleber als Phagozytosemodell für Erythrozyten 107
4.2.1.	Spezielle Aspekte der Leberperfusion 107
4.2.2.	Herkunft der Erythrozyten 111
4.3.	Trennverfahren 113
4.4.	Neuraminsäuregehalt von Erythrozyten- fraktionen nach Dichtentrennung und Neuraminidasebehandlung 115

	Seite
4.5.	Einfluß der Alterung in vivo
4.6.	Alterierung in vitro - ein Modell der in vitro-Alterung von Erythrozyten
4.6.1.	Fixation mit Glutaraldehyd, hypotone Hämolyse
4.6.2.	Abspaltung von N-Acetylneuraminsäure (NANA)
5.	ZUSAMMENFASSUNG
6.	LITERATUR

1. Einleitung

Der reife Erythrozyt ist kernlos, hat deswegen die Fähigkeit zur Proteinbiosynthese verloren, sodaß sein Stoffwechsel verhältnismäßig einfach ist und bei ihm die irreversiblen Prozesse der Alterung während der artspezifischen Lebensdauer der Einzelzelle kontinuierlich ablaufen.

Seine Elimination erfolgt schließlich im reticulo-endothelialen System (RES), vor allem in Leber und Milz. Diese Unabhängigkeit der Alterungsvorgänge vom genetischen Material der alternden Zelle machen den Erythrozyten zusammen mit seiner Stabilität, leichten Zugänglichkeit und relativen Einheitlichkeit zu einem interessanten Modell für gerontologische Studien (97, 98).

Zur Untersuchung von Erythrozyten verschiedenen Alters können prinzipiell zwei Wege beschritten werden. Aus frisch gewonnenem Blut kann einmal mit verschiedenen Verfahren eine Trennung in unterschiedliche, in vivo gealterte Erythrozyten vorgenommen werden. An Trennverfahren können genannt werden: Hypotone Hämolyse (29), Gegenstromverfahren (131), Dichtegradientenzentrifugation beispielsweise mit Phtalat-Estern (10, 28) und Ultrazentrifugation (92, 98). Die Gültigkeit solcher Verfahren wird allgemein durch Markierungsverfahren der Erythrozyten mit ^{59}Fe nachgeprüft, wie dies zum Beispiel für das Verfahren von PLATT et al. (98) geschehen ist (52).

Die zweite Möglichkeit besteht darin, in vitro an Erythrozyten Veränderungen zu bewirken, wie sie bei in vivo gealterten roten Blutzellen zu beobachten sind. Beispiele einer derartigen Alternssimulation sind: Verminderung von intrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP) (83), Verminderung des Gehalts der Zellmembran an N-Acetylneuraminsäure (NANA) (7, 32, 41, 58), Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ (62), Erhöhung der Membranrigidität (45). Eine Überprüfung der Annäherung an physiologische Alterungsvorgänge dieser künstlich veränderten Erythrozyten kann durch den Vergleich ihrer Eigenschaften oder Überlebenszeiten im Organismus mit denen der in vivo gealterten roten Blutzellen versucht werden.

Die für die Elimination gealterter Erythrozyten verantwortlichen Zellen wurden erstmals von ASCHOFF (5) als reticulo-endotheliales System (RES) umfassend dargestellt. Einer modifizierten Klassifikation zufolge (16) gehören dem RES folgende Zellpopulationen an:

Mikroglia

Retikulumzellen des lymphatischen Gewebes

Gewebsmakrophagen (Histiozyten)

Blutmakrophagen

Makrophagen der Lymphsinus

Makrophagen der Blutsinus in Leber (von Kupffer'sche Sternzellen), Milz, Knochenmark, Nebennierenrinde und Hypophysenvorderlappen.

Aufgrund der gemeinsamen Herkunft aus der haematopoetischen Entwicklungsreihe (26, 39), sowie aufgrund morphologischer, immunologischer und cytochemischer Kriterien (81) wurde ein Teil dieser Zellen unter dem Begriff des mononukleären Makrophagensystems (MPS) neu zusammengefaßt (37, 38, 61). Weil dies aber nicht unwidersprochen blieb (130), soll im folgenden weiterhin der Begriff des reticulo-endothelialen Systems (RES) verwandt werden.

Zur Untersuchung von Aspekten der altersabhängigen Erythrozytenelimination durch das RES wird ein dafür geeignetes Modell benötigt. Neben Versuchen am intakten Organismus (58) hat man bisher auch Zellpräparationen benutzt. So wurden von Kupffer'sche Sternzellen isoliert (4, 68, 89), Peritonealmakrophagen (75) und Blutmonozyten (60, 62) sowie Leber- und Milzschnitte verwendet (58).

Die Makrophagen der Leber, die von Kupffer'schen Sternzellen, spielen quantitativ eine große Rolle in der Elimination alter Erythrozyten (52). Sie stellen außerdem etwa 80 - 90% der gesamten Zellzahl wie auch der funktionellen Kapazität des RES (16, 54). Durch Isolierung der Leber und zeitlich begrenzte Aufrechterhaltung ihrer Stoffwechselvorgänge würde also auch die Isolierung eines großen Teiles des RES ermöglicht. Die Komplexität der Verhältnisse am intakten Organismus könnte damit reduziert werden, ohne jedoch eingreifende

Veränderungen am Organgefüge (wie bei den Kupfferzellpräparationen oder Makrophagenzellkulturen) in Kauf nehmen zu müssen.

Methoden zur Perfusion der isolierten Rattenleber wurden bereits von mehreren Autoren beschrieben (51, 114, 121, 141). Dabei handelte es sich meist um hämoglobinfreie Perfusionsmedien, weil man bestrebt war, das eiweiß- und zellhaltige heterogen zusammengesetzte Blut durch ein besser standardisierbares Medium zu ersetzen. Die isoliert perfundierte Rattenleber wurde in der Vergangenheit bereits zu Phagozytoseversuchen eingesetzt. Für Phagozytoseversuche mit Erythrozyten mußten jedoch die bisherigen Bedingungen überprüft und weiterführende Eigenschaften dieses Modells gefunden werden.

Auf dieser Grundlage sollte in der vorliegenden Arbeit folgenden Fragen nachgegangen werden:

1. Inwieweit kann bei in vivo gealterten Erythrozyten, nach Ausschluß einer artifiziellen Schädigung, ihre Phagozytose durch das RES der Leber als Kriterium für "erkennbar alt" herangezogen werden?
2. Ist es möglich, durch Alterierung der Erythrozytenmembran Phagozytose dieser Zellen auszulösen, um damit ein Modell der in vivo ablaufenden altersabhängigen Veränderungen zu erhalten?
3. Können Erkennungs- und Eliminationsmechanismen der Makrophagen bezüglich alter, beziehungsweise alterierter Erythrozyten näher bestimmt werden?

2. Material und Methoden

2.1. Leberperfusion

2.1.1. Versuchstiere

Es wurden männliche Sprague Dawley-Auszuchtratten mit einem mittleren Gewicht von 450 Gramm verwendet. Das Alter der Tiere lag zwischen 3 und 9 Monaten. Die Ratten wurden bis 30 Min. vor der Operation, ad libitum mit Standardfutter und Wasser versorgt.

2.1.2. Operation

Dreißig Minuten vor Beginn der Operation wurden die Tiere aus dem Tierstall geholt und durch intraperitoneale Injektion von 18 mg Pentobarbital narkotisiert.

Bei der auf dem Rücken liegenden Ratte wurde die linke Vena iliaca communis präpariert und in diese 3000 IE Natriumheparinat injiziert.

Danach folgte die Eröffnung des Abdomen durch einen Längsschnitt in der Mittellinie. Vom Processus xyphoideus sternii aus wurden nach den Seiten, an den Rippenbögen entlang, zwei Entlastungsschnitte angelegt. Magen und Dünndarm wurden nun zur Seite herausgestrichen, sodaß sich die Vena cava inferior und die beiden Nieren darstellten. Nach der Eröffnung des Retroperitonealraumes wurden oberhalb der venösen Zuflüsse aus den Nieren an der Hinterwand der Vena cava inferior entlang zwei Fäden für spätere Ligaturen gezogen.

Die Darstellung der Vena portae sowie das Legen dreier Fäden um die Pfortader für spätere Ligaturen, schloß sich an. Der dem Leberhilus am nächsten liegende Faden hatte zwischen sich und der Leber kein einmündendes Gefäß.

Anschließend wurde die Pfortader in etwa vier Zentimeter Entfernung zum Hilus mit einer Pinzette unterfaßt und gespannt hochgezogen. Damit sistierte der Blutfluß in der Pfortader, sodaß beim nun folgenden schrägen Einschnitt in das Gefäß zwischen Pinzette und Leber kaum Blut abfloß. In die Öffnung wurde eine Kanüle mit luftblasenfrei laufendem, oxygenierten Perfusionsmedium eingeführt.

Das Organ blieb nur die kurze Zeit vom Abklemmen der Pfortader bis zum Einschieben der Kanüle ohne Sauerstoffversorgung. Die richtige Lage der Pfortaderkanüle ließ sich durch die schnelle und gleichmäßige Entfärbung sämtlicher Leberlappen erkennen. Lag die Pfortaderkanüle ordnungsgemäß, so wurde sie durch das Knüpfen des ersten Fadens gesichert und die Vena cava inferior unterhalb der Zuflüsse aus den Nieren durchtrennt. Nach der unter 2.1.9 beschriebenen Gewinnung von Rattenblut wurden noch die restlichen beiden Ligaturen um Pfortader und Kanüle geknüpft.

Dann wurde der Thorax geöffnet, zwei Fäden um die Vena cava inferior thoracica unterhalb ihrer Einmündung in den rechten Vorhof angebracht, der rechte Vorhof eröffnet und ein kurzer Katheter bis auf die Höhe des Diaphragmas eingeschoben. Nachdem auch diese Kanüle durch Knüpfen der vorbereiteten Fäden gesichert war, wurde die Leber vom Zwerchfell, Magen, der Milz und dem Duodenum abpräpariert. Vor dem endgültigen Lösen aus den Strukturen des Retroperitoneums wurden die bisher noch offenen Ligaturen um die Vena cava inferior oberhalb der Einmündungen der Nierenvenen geschlossen und der Abfluß des Perfusionsmediums über den Katheter im rechten Vorhof kontrolliert. Dies mußte ohne Stauung der Leber möglich sein. Mit dem Durchtrennen der letzten Verbindungen zum Retroperitonealraum, wurde die Operation beendet. Die Leber konnte aus dem Situs genommen und zur eigentlichen Perfusion in der Perfusionsapparatur befestigt werden.

2.1.3. Perfusionsapparatur

2.1.3.1 Aufbau

Der prinzipielle Aufbau der Leber-Perfusionsapparatur besteht aus der isolierten Rattenleber, einer Rollenpumpe, einer artifiziellen Lunge und Blasenfängern. Diese Teile sind durch ein Schlauchsystem miteinander verbunden, das von oxygeniertem Perfusionsmedium durchspült wird. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 1 wiedergegeben.



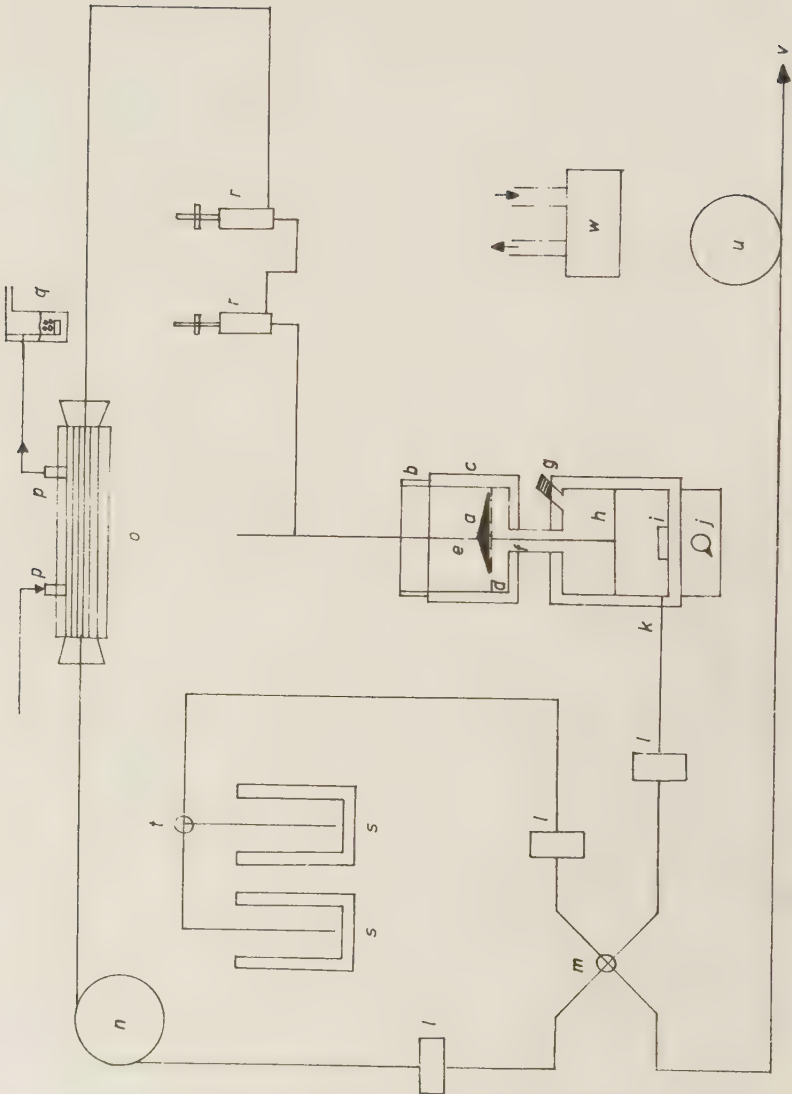


Abb. 1: Skizze der Perfusionsapparatur
(Legende siehe Seite 7)

Legende:

a: Leber - b: Abnehmbarer Deckel - c: Leberkammer
d: Auflagefläche für die Leber - e: Katheter in der
Pfortader - f: Katheter im rechten Atrium - g: Öffnung
zur Probeentnahme, während der Perfusion mit einem
Stöpsel verschlossen - h: Vorratsgefäß mit Perfusions-
medium für die zyklische Perfusion - i: Magnetrührer -
j: Magnetrührgerät - k: Ausfluß - l: Filter-
m: Vierwegehahn zum Umschalten von zyklischer auf
offene Perfusion und umgekehrt - n: Rollenpumpe -
o: "Lunge" - p: Zu- und Abstrom der Sauerstoffversorgung
der Lunge - q: Ausperlgefäß - r: Blasenfänger
s: Vorratsgefäße für die offene Perfusion - t: Dreiwege-
hahn - u: Rollenpumpe - v: Auslauf - w: Umwälzthermostat
für die beheizbaren Gefäße

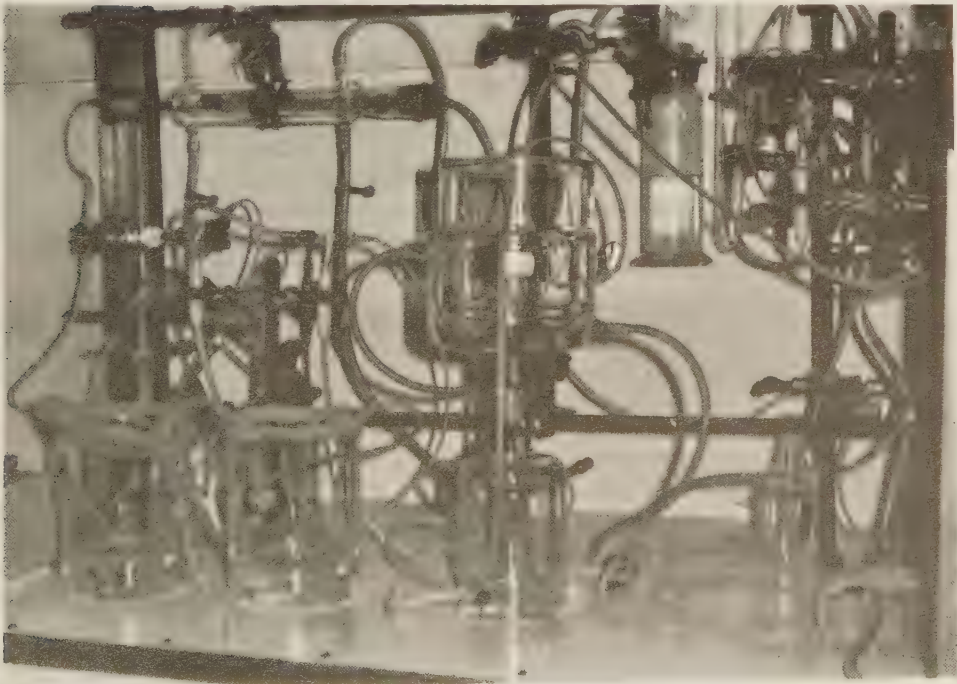


Abb. 2: Versuchsaufbau der Perfusionsapparatur (128)

2.1.3.2 Beschreibung

Lunge:

Die Lunge (o) arbeitet nach dem Prinzip von Membran - Oxygenatoren. Im Gegensatz zu den auch häufig verwendeten Oxygenatoren mit einer Austauschoberfläche zwischen Gas und Flüssigkeit, wie bei den Film- (107, 87) oder Scheiben-oxygenatoren (51), soll es bei den Membranoxygenatoren zu geringeren Veränderungen organischer Substanzen, wie Lipoproteinen kommen.

Ein Einfluß der Lunge auf die Überlebenszeit der Erythrozyten schien zumindest während der hier verwendeten Versuchsdauer nicht zu bestehen (122).

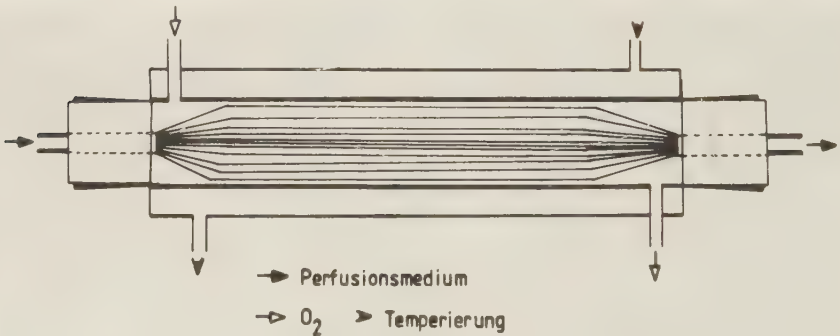


Abb. 3: Skizze der Lunge

Das Perfusionsmedium wird im Innern der Lunge zur Vergrößerung seiner Oberfläche durch 30 feine Silikonschläuche (Lumendurchmesser 0,2 mm/Wanddicke 0,2 mm) gepumpt. Dadurch wird gegenüber dem üblicherweise verwendeten Silikonschlauch, die Oberfläche der Perfusionsflüssigkeit um etwa ein 7-faches vergrößert, der Diffusionsweg auf 1/10 verringert.

Sauerstoffzufuhr (p):

Verwendet wurde Sauerstoff für medizinische Zwecke.

Pro Minute durchströmt ein halber Liter O_2 die Lunge. Zur besseren Kontrolle wird der Sauerstoff, nachdem er die Lunge passiert hat, über ein Ausperlgefäß (q) mit destilliertem Wasser abgeleitet.

Der Sauerstoffpartialdruck in der hämoglobinfreien Grundlösung lag zwischen 400 und 600 mm Hg gemessen mit einem Blutgasanalysator nach ASTRUP.

Rollenpumpe :

Verwendet wurden stufenlos regelbare Rollenpumpen (u). Für die Bestimmung der von ihr geförderten Flüssigkeitsmenge pro Minute, in Abhängigkeit von der Potentiometer-einstellung, wurde eine Eichkurve erstellt. Vor jeder Perfusion wurde die Menge der geförderten Flüssigkeit jedoch noch einmal ausgewogen und im Versuchsprotokoll festgehalten.

Blasenfänger :

Die Blasenfänger (r) sind direkt vor der Leber angebracht. Sie dienen dazu, Luftembolien des perfundierten Organs zu vermeiden.

Vorratsgefäße :

Als Vorratsgefäße für die zyklische Perfusion (h) und die offene Perfusion (s) sind doppelwandige Glasgefäße verwendet worden. Mit Hilfe des Umwälzthermostates wurden sie auf die Perfusionstemperatur von $28^{\circ}C$ erwärmt.

Filter :

Die Filter (l), nach den Vorratsgefäßen und direkt vor der Lunge angebracht, sollten Gewebsteilchen von der Lunge fernhalten, um so das Verstopfen der feinen Silikonschläuche zu verhindern. Die Porengröße der Filter betrug ungefähr 0,2 mm.

Magnetrührer :

Verwendet wurde ein stufenlos regelbarer Magnetrührer. Während der Perfusion wurde eine möglichst niedrige Stufe

eingestellt, um einerseits die Erythrozyten nicht mechanisch zu schädigen, andererseits aber dennoch eine gute Durchmischung der Zellsuspension zu gewährleisten.

Temperaturregelung des Perfusionsmediums :

Die Temperatur des Perfusionsmediums wurde durch ein Umwälzthermostat (w) kontrolliert, das die in Reihe geschalteten, doppelwandigen Glasgefäße mittels der kontinuierlichen Zirkulation von destilliertem Wasser temperierte. Es handelt sich dabei um die Leberkammer (c), die Vorratsgefäße für die zyklische (h) und offene Perfusion (s), sowie die Lunge (o).

Die Einstellung des Umwälzthermostates erfolgte so, daß das Perfusionsmedium am Ende des Pfortaderkatheters die gewünschte Temperatur von 28° C besaß.

Materialien :

Mit dem Perfusionsmedium kommen die Glasgefäße c, h und r sowie der Pfortaderkatheter e und der Vierwegehahn m in Kontakt. Für die möglichst kurz angelegten Schlauchverbindungen werden Silikonschläuche (Lumendurchmesser 1 mm) verwendet.

2.1.4. Durchführung der Leberperfusion

2.1.4.1 Vorbereitung der Apparatur

Dreißig Minuten vor Beginn der Perfusion wurde die Apparatur zwecks Temperaturäquilibrierung in Betrieb genommen. Das Vorratsgefäß für die offene (s) und die geschlossene Perfusion (h) wurde mit Grundlösung (siehe 2.1.5.1) gefüllt. Über das Gefäß (s) wurde auch das restliche Perfusionssystem mit Flüssigkeit versehen und damit entlüftet. Unter Belassung einer Flußrate von 30 ml/min. wurde die Salzlösung über den Pfortaderkatheter wieder in das Vorratsgefäß für die offene Perfusion zurückgeleitet. Bis zur Operation sorgte das eingeschaltete Umwälzthermostat für eine Erwärmung der beheizbaren Gefäße, Perfusionslösungen und aller nicht direkt geheizten Teile.

Kurz vor Beginn der Operation wurde in "zyklischer Perfusion" (siehe 2.1.4.3) die aufgrund des Gewichts der Ratte eingestellte Flußrate nachgemessen. Das Gefäß wurde entleert und mit dem eigentlichen Perfusionsmedium gefüllt. Der Magnetrührer wurde in Gang gesetzt und die Sauerstoffzufuhr zur Lunge geöffnet.

2.1.4.2 Betriebsart "offenes System"

Das "offene System" besteht aus den Vorratsgefäßen (s), einem Dreiwegehahn (t), einem Filter (l), einem Vierwegehahn (m), der Rollpumpe (n), einem weiteren Filter (l), der Lunge (o), den Blasenfängern (r) und schließlich dem Pfortaderkatheter (e). Diese Bestandteile werden vom Perfusionsmedium in der angegebenen Reihenfolge durchfließen. Das "offene System" dient vor allem zur Vorbereitung der Apparatur (siehe 2.1.4.1) und zur Präperfusion (siehe 2.1.4.4) bis zum Umschalten auf die zyklische Betriebsart.

2.1.4.3 Betriebsart "zyklisches System"

Das "zyklische System" besteht aus dem Vorratsgefäß für die zyklische Perfusion (h), einem Filter (l), dem Vierwegehahn (m), der Rollpumpe (n), einem Filter (l), der Lunge (o), den Blasenfängern (r) und dem Pfortaderkatheter (e).

Die Durchströmung mit der Perfusionsflüssigkeit erfolgt in der angegebenen Reihenfolge.

Das zyklische System dient dem eigentlichen Perfusionsversuch.

2.1.4.4 Präperfusion

Wie unter 2.1.2. beschrieben, wurde nach Eröffnen der Pfortader der Katheter (e) mit luftblasenfrei laufendem, oxygenierten Perfusionsmedium eingeführt.

In der Betriebsart des offenen Systems wurde dabei Grundlösung verwendet, und in einer vorher ausgemessenen Perfusionsrate durch die Leber gepumpt. Bis zum Ende der Operation wurde die Rattenleber auf diese Weise entblutet (kenntlich an der gleichmäßigen Entfärbung des Organs), mit Sauerstoff versorgt und auf die gewünschte Temperatur von 28°C abgekühlt.

Vor dem Umschalten auf den zyklischen Betrieb wurden noch 100 ml der auch im eigentlichen Versuch verwendeten, erythrozytenhaltigen Perfusionsflüssigkeit perfundiert. Dies stellte Perfusionssystem wie Leber auf die Ausgangskonzentration an Erythrozyten im Perfusionsmedium des Versuchs ein und verhinderte Änderungen der Erythrozytenkonzentration nach Umstellen auf zyklische Perfusion durch Verdünnungseffekte der Grundlösung. Die während der Präperfusion verwendeten Lösungen werden nach dem Passieren der Leber verworfen.

Mit der Perfusion von Erythrozyten beginnt die Leber sich wieder zu färben. Ebenso wie das Entfärben nach Einführen des Pfortaderkatheters, muß dieser Vorgang gleichmäßig alle Anteile der Leberoberfläche einschließen. Bei fehlender Anfärbung größerer Teile des Organs wurde die Lagerung der Leber in der Perfusionskammer verändert. Gelang damit nicht eine gleichmäßige Anfärbung, so wurde der Versuch nicht in die Auswertung einbezogen.

Toleriert wurden dagegen die selten auftretenden geringen petechialen Einblutungen in das Lebergewebe (87)

Eine ebenfalls zu Beginn der Perfusion auftretende ödematöse Schwellung des Organs konnte regelmäßig durch verbesserte Lagerung rückgängig gemacht werden.

2.1.4.5 Zyklische Perfusion

Am Ende der Präperfusion begann mit dem Umschalten auf die zyklische Betriebsart der eigentliche Perfusionsversuch. Dabei wurden laufend die Färbung der Leber, die Luftblasenfreiheit des Perfusionsmediums sowie die Sauerstoffzufuhr im Ausperlgefäß kontrolliert.

2.1.4.6 Reinigung und Wartung

Nach jeder Perfusion wurde sehr ausgiebig mit mehreren Litern destilliertem Wasser gespült und anschließend alle zugänglichen Teile getrocknet. Dabei wurden besonders die Filter gereinigt oder ersetzt.

In regelmäßigen Abständen wurde die gesamte Apparatur mit Extran (1:1 gemischt mit destilliertem Wasser) gesäubert.

Nach reichlichem Spülen mit aqua destillata wurde 5%-iges Pepsin, gelöst in 0,1 n Salzsäure, durch die Apparatur gepumpt und danach wieder mit ausreichend viel destilliertem Wasser nachgespült und getrocknet.

In größeren Abständen mußten auch die Lungen ausgetauscht werden, da es trotz Filter zur Verstopfung der kleinen Silikonschläuche kam.

Schließlich mußten die Silikonschläuche in der Rollenpumpe wegen des Abriebs von Zeit zu Zeit erneuert werden.



Abb.4: Isoliert perfundierte Rattenleber mit Pfortaderkatheter (oben) und ableitendem Katheter im rechten Atrium (unten)

2.1.5. Perfusionsmedien

2.1.5.1 Grundlösung

Wegen der geringeren Sauerstoffaufnahme und damit des niedrigeren Energieverbrauchs der isoliert perfundierten Rattenleber (siehe 4.1.) wurde für die Perfusion während der Operation eine substratfreie Salzlösung hergestellt. Sie ist in ihrer Zusammensetzung, pH und Osmolarität dem Säugetierserum ähnlich und dient als Grundlage für die substrathaltige Stammlösung.

Zusammensetzung:

Natriumchlorid (NaCl)	110,0 mmol/l
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	20,0 mmol/l
Calciumdichlorid (CaCl_2)	0,25 mmol/l
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	1,2 mmol/l
Kaliumchlorid (KCl)	4,7 mmol/l
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	1,2 mmol/l
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	20,0 mmol/l

Der pH-Wert wurde auf 7,40 eingestellt.

Die chemischen Substanzen wurden von der Fa. Merck bezogen.

2.1.5.2 Stammlösung

Der Unterschied zur Grundlösung besteht in einem Glucose-, Lactat- und Pyruvatzusatz und zur Konstanthaltung der Osmolarität entsprechender Verminderung des Natriumchloridgehaltes. Die Glucose-, Lactat- und Pyruvatwerte sind ebenfalls den physiologischen Werten im Rattenblut angenähert. Auf einen Zusatz von Albumin zum Aufbau eines kolloidosmotischen Drucks, sowie als Stickstoff- und Aminosäurequelle für die Leber, wurde verzichtet (114).

Zusammensetzung der Stammlösung:

Natriumchlorid (NaCl)	102,1 mmol/l
Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	5,5 mmol/l
Lactat ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$)	2,0 mmol/l
Pyruvat ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$)	0,3 mmol/l

Die weitere Zusammensetzung entspricht der Grundlösung. Die-ser Stammlösung wurden - den Perfusionsserien entsprechend -

verschiedene Präparationen gewaschener Erythrozyten in einer Konzentration von $12 - 15 \times 10^6$ pro Milliliter (ml) zugesetzt.

2.1.6. Weitere Versuchskonstanten

Flußrate des Perfusionsmediums:

Pro Minute und Gramm Lebertrockengewicht sollten mindestens 5 ml Perfusionsmedium das Organ passieren. Als obere Grenze wurden 7 ml pro Minute und Gramm Lebertrockengewicht nicht überschritten. Bei Flußraten über 10 ml in orientierenden Vorversuchen traten gehäuft makroskopisch sichtbare Einblutungen in das Lebergewebe auf.

Temperatur des Perfusionsmediums:

Die Temperatur des Perfusionsmediums am Ausgang des Pfortaderkatheters betrug 28°C .

Perfusionsvolumen im offenen System:

Während der etwa zehnmütigen Operation wurden 300 ml Grundlösung durch die Leber gepumpt.

Die Perfusionsmenge für die Sättigungsperfusion (siehe 2.1.4.4) betrug 100 ml.

Die Perfusionsmenge im zyklischen System betrug zu Beginn des Versuchs 150 ml.

Anzahl der Probeentnahmen, Entnahmevolumen:

Zu den Zeitpunkten 1, 20, 40, 60, 80, 100, 120 Minuten wurden jeweils 5 ml Perfusionsmedium aus dem Vorratsgefäß für die zyklische Perfusion mittels einer Kolbenhubpipette entnommen. Bei den 7 Entnahmen wurden insgesamt 35 ml aus dem Perfusionskreislauf entfernt.

Perfusionsdauer:

Die Dauer der Perfusion betrug 2 Stunden.

2.1.7. Messungen und Bestimmungen

2.1.7.1 Rattengewicht

Nach Eintritt der Narkose wurde die Ratte auf einer Laborwaage auf 1/10 g genau gewogen.

2.1.7.2 Lebertrockengewicht

Nach Beendigung der Perfusion wurde die Leber in einen

Trockenschrank gelegt und bei 60°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Lebertrockengewicht wurde anschließend auf einer Laborwaage auf 1/100 g genau bestimmt.

2.1.7.3 Flußrate

Die abhängig vom Gewicht der Ratte eingestellte Perfusionsrate wurde vor jeder Perfusion gemessen. Dabei wurde die Flüssigkeitsmenge gewogen, die die Rollenpumpe in einer Minute aus dem Vorratsgefäß für die zyklische Perfusion bei der eingestellten Flußrate abzupumpen in der Lage war. Unter Inkaufnahme einer geringen Ungenauigkeit wurde als Wert des spezifischen Gewichts der Perfusionslösung 1,00 angenommen. Die Höhe des Flows in ml/min. wird im Versuchsprotokoll vermerkt.

Aufgrund der von anderen Mitarbeitern des Instituts für Gerontologie (128) durchgeführten Versuche, zeigte sich eine enge Korrelation zwischen Lebendgewicht der Ratte und Trockengewicht der Leber. Der prozentuale Anteil des Lebertrockengewichts betrug ca $1,1\% \pm 0,1$. Deswegen wurde aufgrund des Rattenlebendgewichts eine geschätzte relative Flußrate 5-6 ml/min/g Lebergewicht eingestellt. Nach Erhalt des Lebertrockengewichts wurde die tatsächliche Flußrate während des Versuchs ermittelt.

2.1.7.4 Plan der Probenaufarbeitung

Zu jedem Entnahmezeitpunkt (siehe 2.1.6.) wurden 5 ml Perfusionsmedium aus dem Gefäß für zyklische Perfusion entnommen und zu folgenden biochemischen Bestimmungen herangezogen.

Art der Bestimmung	Volumen
Entnommenes Probenvolumen	5,000 ml
a) Hämoglobinbestimmung ("Gesamthämoglobin")	0,600 ml
b) Zellzahlbestimmung	0,400 ml
Zentrifugation der verbleibenden 4,000 ml bei 1000 x g für fünf Minuten.	
c) Hämoglobinbestimmung im Überstand	0,600 ml
d) Kaliumbestimmung im Überstand	0,500 ml

e) Bestimmung der Enzymaktivitäten von GOT

und GPT im Überstand

0,200 ml

Von den restlichen 2,700 ml wurden 2,000 ml enteiweißt und bei + 4°C für die Bestimmung von Glucose, Lactat, Pyruvat, Hydroxybutyrat und Acetoacetat aufbewahrt. Die verbleibenden 0,700 ml wurden verworfen.

Die Bestimmungen a, b, c, e wurden sofort nach dem Perfusionsversuch, die Bestimmung d sowie die Messung aus der enteiweißten Lösung innerhalb von zwei Wochen durchgeführt.

2.1.8. Gewinnung von Rattenerythrozyten

Wie unter 2.1.2. beschrieben, wurde nach dem Einführen des Pfortaderkatheters und seiner vorläufigen Befestigung in der Vena portae sofort die Vena cava inferior unterhalb der venösen Zuflüsse aus den Nieren eröffnet. Das nun in die Peritonealhöhle fließende Blut, beziehungsweise Gemisch aus Blut und Grundlösung, ließ sich mit einer Einmalspritze abziehen. Pro Versuchstier wurden ca 40 ml entnommen und mit 4000 I.E. Natriumheparinat antikoaguliert. Das gewonnene Gemisch aus Blut und Grundlösung wurde in einer Hettich Laborzentrifuge bei 1000 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dabei ließ sich die auf den Erythrozyten liegende, und vor allem aus Leukozyten bestehende weißliche Schicht (buffy coat) mit-entfernen.

Die verbleibenden Erythrozyten wurden mit mindestens dem fünffachen Volumen an 0,9%-iger Kochsalzlösung versetzt, gemischt und bei 1000 x g 5 Minuten lang zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde dieser Vorgang noch zweimal wiederholt.

Danach wurden die roten Blutzellen entweder sofort weiterverwendet, oder mit 10 ml glucosehaltiger Stammlösung vermisch bis zur Weiterverwendung am folgenden Tag bei +4°C aufbewahrt.

Für alle Perfusionen wurden, mit Ausnahme der Serie V Erythrozyten verwendet, die eine Nacht bei +4°C gelagert waren.

2.1.9. Hämatologische Versuchsparameter

2.1.9.1 Hämoglobinbestimmung

Sie erfolgte mit der Hämoglobincyanid-Methode in Form der Test-Combination Nr. 124 729 von Boehringer. Dabei wurden 600 Mikroliter Probe mit 100 Mikroliter Farbreagenz vermischt und die Extinktion nach frühestens einer Minute in einem Eppendorf Photometer bei einer Wellenlänge von 546 nm und einer Schichtdicke von 1 cm abgelesen. Die Messung erfolgte gegen einen Leerwert aus 600 Mikroliter Perfusionslösung mit 100 Mikroliter Farbreagenz. Die Berechnung der Hämoglobinkonzentration der Probe erfolgte über den molaren Extinktionskoeffizienten des Hämoglobincyanidkomplexes bei 546 nm, für den $4,40 \times 10^4$ l/mol x cm eingesetzt wurden. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ergibt sich für die Bestimmung die Konzentration C in mg/100 ml aus $C = 175 \times$ Extinktion E. Die Gültigkeit des Faktors auch beim angegebenen Pipettierschema wurde überprüft.

2.1.9.2 Erythrozytenzählung

Sie erfolgte in einem Coulter Counter Modell F.N. Dabei wurden 100 Mikroliter aus der entnommenen Probe in 10 Milliliter isotoner, zur Verwendung am Counter vorgeschriebener Flüssigkeit pipettiert. Die so erzielte Verdünnung entspricht der für den Arbeitsbereich des Zählgerätes angemessenen Verdünnung. Die abgelesenen Zahlen wurden anhand der dem Zähler beiliegenden Korrekturtafel berichtigt. Der korrigierte Wert mußte mit 2 multipliziert und der Einheit $\times 10^6$ Erythrozyten/ml versehen werden, um die Konzentration der roten Blutzellen im Perfusionsmedium wiederzugeben.

2.1.10. Biochemische Kontrollparameter

2.1.10.1 Kaliumbestimmung

Sie wurde mit Hilfe eines Flammenphotometers vom Typ FL 6 (Firma Zeiss) nach vorheriger Überprüfung seiner Eichung mittels eines Standards ausgeführt. Die Konzentration wird in mval/l angegeben.

2.1.10.2 Enzymaktivitätsbestimmungen von GOT und GPT

Für die Aktivitätsbestimmungen der Enzyme Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) wurden Testsätze von Boehringer (Nr.124451 u.124524) benutzt. Dabei setzte sich der Reaktionsansatz aus 0,100 ml Probe und 0,500 ml Testreagenz zusammen. Die Extinktionsänderung des Indikatorsystems NADH/NAD bei 365 nm, 25°C, einem cm Schichtdicke pro Minute, diente als Maß für die Enzymaktivität. Der Faktor betrug 1765, die Einheit der so berechneten Aktivität Unit/Liter(U/l).

2.1.10.3 Enteiweißung

Der Entschluß zur Enteiweißung beruhte auf den für Lactat, Pyruvat, Beta-Hydroxybutyrat und Acetoacetat vorzufinden den Hinweisen auf die Stabilität dieser Substanzen in enteiweißten Lösungen (15). Bei ihren Bestimmungen konnten außerdem die aus der Leber stammenden Enzyme das Ergebnis nicht verfälschen.

Zur Enteiweißung wurden 0,4 ml 10%-iger eiskalter Perchlorsäure mit 2,0 ml Probe vermischt und bei Zimmertemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 0,6 ml 40%-iger K_2HPO_4 und sofortigem Mischen, wurden die Proben in ein Eisbad gestellt. 30 Minuten danach wurde bei 1000 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und bis zur Bestimmung der genannten Substanzen bei + 4°C verschlossen aufbewahrt. Die dadurch entstandene Verdünnung wurde in den Ergebnissen berücksichtigt.

2.1.10.4 Glucosebestimmung

Sie erfolgte nach der Glucoseoxydasemethode mit der Test-Kombination Glucose Nr.124036 von Boehringer, in der dort beschriebenen Mikrolitertechnik. Ausgangspunkt bildete die enteiweißte Fraktion der Proben. Die Konzentration der Glucose in mmol/l ergab sich aus der Berechnung über eine Standard-Konzentration.

2.1.10.5 Lactat

Lactat wurde nach den Angaben von HOHORST (53) gemessen.
Der Bestimmungsansatz bestand aus folgenden Substanzen:

Alkalischer Glycin-Hydrazin-Puffer	
(Lösung II)	0,450 ml
NAD-Lösung (Lösung III)	0,050 ml
Destilliertes Wasser	0,480 ml
Probe	0,020 ml

Die Messung erfolgte bei einer Schichtdicke von 1 cm, 25°C, einer Wellenlänge von 365 nm in einem Eppendorf-Photometer. In der Vergleichsküvette befand sich statt der Probe das entsprechende Volumen an destilliertem Wasser.

Der Küvetteninhalt wurde gemischt, auf Raumtemperatur gebracht und die Konstanz der Extinktion durch zweimalige Messung sichergestellt. Nach dieser Feststellung der Ausgangsextinktion (E_1) wurde die Lactathydrogenase (LDH)-Suspension dazugemischt, die Reaktion damit gestartet:

LDH-Suspension	0,010 ml
----------------	----------

Die Extinktion E_2 wurde nach 10 und 20 Minuten abgelesen. Die Reaktion lief jedoch unter den hier vorliegenden Bedingungen und Konzentrationen regelmäßig innerhalb der ersten 10 Minuten ab.

Die verwendeten Lösungen wurden folgendermaßen hergestellt:

Lösung I:-

7,5 g Glycin
5,2 g Hydrazinsulfat
0,2 g EDTA- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{x}2\text{H}_2\text{O}$ (EDTA: Ethylendiamintetraacetat)
ad 50 ml mit destilliertem Wasser.
Lösung I kann über längere Zeit aufbewahrt werden.

Lösung II:-

2 N Natronlauge mit dem gleichen Volumen der Lösung I vermischt.
Die Lösung II wurde nur innerhalb einer Woche verwendet.

Lösung III:

40 mg NAD (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid) in 1 ml destilliertem Wasser gelöst.

Lösung III wurde immer frisch hergestellt.

LDH-Suspension:

Die industriell hergestellte Enzymsuspension (Fa.Boehringer) wurde mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:1 verdünnt, wobei diese Verdünnung zu jedem Versuch frisch hergestellt wurde.

Die Berechnung erfolgte über einen Faktor F, der aus einer Eichkurve ermittelt wurde und aus der Extinktionsänderung $E = E_2 - E_1$. Probenkonzentration c von Lactat, $c_{\text{Lactat}} = (E_2 - E_1) \times 178,73$; das Ergebnis hat die Einheit mg/100 ml. Für die Bestimmung wurden Präzisionskontrollen durchgeführt.

2.1.10.6 Pyruvat

Die Bestimmung von Pyruvat erfolgte ebenfalls enzymatisch mit NAD/NADH + H^+ als Indikatorsystem für die photometrische Extinktionsbestimmung.

Folgender Bestimmungsansatz wurde verwandt:

Lösung II	0,500 ml
Probenlösung	0,500 ml

Die Messung der Ausgangsextinktion E_1 erfolgte gegen eine Vergleichslösung mit destilliertem Wasser statt der Probe. Die Extinktionsbestimmung fand in einem Eppendorf-Spektrallinienphotometer bei 365 nm Wellenlänge, einer Schichtdicke von 1 cm und einer Temperatur von 25°C statt. Die Ausgangsextinktion wurde durch eine zweite Messung auf Stabilität kontrolliert. Durch Zugabe von

LDH-Suspension	0,010 ml
----------------	----------

wurde die enzymatische Reaktion gestartet. Nach 10 Minuten konnte die Extinktion E_2 gemessen und nach weiteren 10 Min. auf Abschluß der Reaktion hin kontrolliert werden, die aber regelmäßig vor Ablauf der ersten 10 Minuten eintrat..

Die verwendeten Lösungen setzten sich folgendermaßen zusammen:

Lösung I:

Trispuffer (Tris: Tris-hydroxymethyl-amino-methan)
mit 1,2114 g Tris pro 100 ml aqua destillata.
Diese Lösung kann über längere Zeit aufbewahrt werden.

Lösung II:

2 mg NADH (reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-
Dinucleotid (NAD)) wurden in 5 ml Trispuffer
(Lösung I) gelöst.
Lösung II wurde vor jeder Bestimmung frisch angesetzt.

Lösung III:

LDH-Suspension (siehe bei Lactat 2.1.10.5)

Die Berechnung der Konzentration an Pyruvat in der Probe,
 c_{Pyruvat} - erfolgte über einen aus einer Eichkurve ermittelten
Faktor F und der Extinktionsänderung $\Delta E = E_1 - E_2$:
 $c_{\text{Pyruvat}} = F \times (E_1 - E_2)$. Bei $F = 6,402$ ergibt sich für
 c_{Pyruvat} die Benennung mg/100 ml. Für die Bestimmung
wurden Präzisionskontrollen durchgeführt.

2.1.10.7 Beta-hydroxybutyrat (Beta - OH-B)

Die Bestimmung folgte den Angaben von WILLIAMSON und
MELLANBY (138). Der Bestimmungsansatz setzte sich folgen-
dermaßen zusammen:

Lösung II (Hydrazin-Tris-Puffer)	0,200 ml
Lösung III (NAD-Lösung)	0,100 ml
Probenlösung	0,400 ml

Der Ansatz wurde gemischt, auf Raumtemperatur gebracht, die
Ausgangsextinktion E_1 in einem Eppendorf-Photometer bei einer
Schichtdicke von 1 cm, einer Temperatur von 25°C und einer
Wellenlänge von 365 nm, gegen eine Vergleichsküvette mit
aqua destillata statt Probe, gemessen. Die Stabilität der
Extinktion E_1 wurde durch nochmalige Messung kontrolliert.

Durch Zugabe von

Lösung IV (3-Hydroxybutyrat-
Dehydrogenase, HBDH)

0,010 ml

wurde die enzymatische Reaktion gestartet. Die Extinktion E_2 konnte 40 Minuten nach Start der Reaktion abgelesen werden. 10 Minuten danach wurde durch eine weitere Messung die Konstanz von E_2 kontrolliert.

Die verwendeten Lösungen setzen sich wie folgt zusammen:

Lösung I : (Tris-Puffer)

2,42 g Tris (Tris-hydroxymethyl-amino-methan) wurde mit destilliertem Wasser auf 100 ml, nach Zugabe von 6 ml 1 N HCl mit aqua destillata auf 200 ml aufgefüllt und mit HCl ein pH von 8,5 eingestellt. Diese Lösung ist über längere Zeit hinweg haltbar.

Lösung II : (Hydrazin-Tris-Puffer)

1 ml Hydrazinhydrat, 20 mg $\text{EDTA-Na}_2\text{H}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ Äthylendiamin-Tetraacetat als Natriumsalz mit Kristallwasser und 5 ml 1 N HCl wurden mit 20 ml Tris-Puffer (Lösung I) gelöst. Diese Lösung wurde täglich frisch angesetzt.

Lösung III : (NAD-Lösung)

20 mg NAD wurden in 2 ml aqua destillata gelöst. Auch die Lösung III wurde vor jeder Bestimmung frisch hergestellt.

Lösung IV : (HBDH-Enzymsuspension, Fa.Boehringer)

Die käufliche Enzymsuspension wurde mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:1 vor jeder Bestimmung frisch verdünnt.

Die Berechnung der Konzentration an D-(-)-3-Hydroxybutyrat, $c_{\text{Beta-OH-B}}$ erfolgt über einen aus einer Eichkurve ermittelten Faktor F sowie aus der Extinktionsänderung $\Delta E = E_2 - E_1$:
 $c_{\text{Beta-OH-B}} = F \times (E_2 - E_1)$. Bei $F = 15,606$ ergab sich die Konzentration in mg/100 ml. Für die Bestimmung wurden Präzisionskontrollen durchgeführt.

2.1.10.8 Acetoacetat

Die Bestimmung hält sich an die Vorschrift von MELLANBY und WILLIAMSON (85). Das Pipettierschema der Bestimmung stellte sich folgendermaßen dar:

Lösung I (Phosphat-Puffer)	0,200 ml
Lösung II (NADH-Lösung)	0,020 ml
Probenlösung	0,400 ml

Die Messung der Ausgangsextinktion E_1 erfolgte gegen eine Vergleichsküvette mit destilliertem Wasser statt Probenlösung in einem Eppendorf-Photometer bei den unter 2.1.10.7 genannten Bedingungen. Die Stabilität von E_1 wurde durch nochmalige Messung kontrolliert. Mit Zugabe von Lösung IV (HBDH) 0,010 ml wurde die Reaktion gestartet. Die Extinktion E_2 wurde 10 Minuten nach Start der Reaktion abgelesen und nach weiteren 10 Minuten kontrolliert.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Lösung I : (Phosphat-Puffer):

13,6 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) und 17,4 g Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) wurden jeweils mit 1000 ml aqua destillata gelöst, zu gleichen Teilen vermischt und auf einen pH-Wert von 6,8 mit Salzsäure (HCl) eingestellt. Dieser Phosphatpuffer ist längere Zeit haltbar.

Lösung II : (NADH-Lösung)

20 mg reduziertes Nikotinamid-adenin-dinucleotid wurden in 4 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung II wurde vor jeder Bestimmung frisch angesetzt.

Lösung IV : (HBDH)

Sie entsprach der Lösung IV unter 2.1.10.7

Die Berechnung der Konzentration an Acetoacetat, c_{AcAc} , in der Probe erfolgte über einen aus einer Eichkurve ermittelten Faktor F sowie aus der Extinktionsänderung

$\Delta E = E_1 - E_2 : c_{AcAc} = F \times (E_1 - E_2)$. Bei $F = 7,953$ ergab sich c_{AcAc} als Konzentration mit der Benennung mg/100 ml. Für die Bestimmung wurden Präzisionskontrollen durchgeführt.

2.1.10.9 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Nach Beendigung der Perfusion wurden einige Rattenlebern der Serien III und V durch Perfusion mit 40 ml Yellow-Fix fixiert und kleine Gewebeproben davon in der Fixationslösung 2 Stunden lang aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben in Cacodylat-Puffer gespült, eine Stunde in 1%-iger Osmium-Lösung nachfixiert und in Dorcopan eingebettet.

Die Dünnschnitte (Gerät: NoUz, Firma Reichert) wurden mit Uranylacetat und Bleizitrat nachkontrastiert und im Elektronenmikroskop (Gerät: EM 952, Firma Zeiss) untersucht. Die Vergrößerung war etwa 11000-fach.

Die elektronenoptische Auswertung erfolgte mit Unterstützung von Herrn Prof. Dr. B. Schnorr, Veterinär-Anatomisches Institut der Julius-Liebig-Universität, Gießen.

2.2. Trennung von Rattenerythrozyten

Die Dichte roter Blutzellen steigt mit zunehmendem Lebensalter an (19, 23, 28). Diese Eigenschaft wird benutzt um Erythrozyten ihrem Alter gemäß zu trennen. Die Gültigkeit dieses Verfahrens wurde durch radioaktive Markierung junger Erythrozyten mit ^{59}Fe nachgeprüft (52).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Verfahren nach PLATT et al. (98) und MURPHY (92) vergleichend verwendet.

2.2.1. Trennung nach PLATT et al.

Rattenerythrozyten wurden, wie unter 2.1.8. beschrieben, gewonnen und aufbereitet. 10 ml der durch die letzte Zentrifugation gepackten roten Blutzellen wurden in vorher gewogene Zentrifugenröhrchen pipettiert.

Zur Trennung diente ein Ausschwingrotor (Beckman Instr.) SW 40 und eine Ultrazentrifuge (Beckman Instr.) vom Typ L 8-55.

Die Zentrifugation im vorgekühlten Rotor bei 4°C und $100.000 \times g$ dauerte 4 Stunden.

Nach Beendigung wurde der Überstand und die oberste dünne, weißliche Schicht vorsichtig abgehoben. Aus der Differenz des jetzigen Gewichts zum Leergewicht des Röhrchens konnte die Schwere der Erythrozytensäule ermittelt und rechnerisch in Fraktionen von 10%, 80% und wieder 10% eingeteilt werden. Mit einer Kolbenhubpipette wurden diese rechnerisch ermittelten Teile unter Gewichtskontrolle abgehoben, in Stammlösung suspendiert und auf Volumina von 5 ml, 40 ml sowie 5 ml aufgefüllt. Daraus wurden die unter 2.4. genannten Parameter bestimmt.

Anschließend lagerten die roten Blutzellen bis zur Weiterverwendung bei $+4^{\circ}\text{C}$ in der glucosehaltigen Stammlösung.

2.2.2. Trennung nach MURPHY

Das folgende Trennverfahren lehnt sich geringfügig modifiziert an die Angaben von MURPHY (92) an.

Rattenerythrozyten wurden, wie unter 2.1.8. beschrieben, gewonnen. 5 ml der durch die letzte Zentrifugation gepackten roten Blutzellen wurden in ein vorher gewogenes Zentrifugenröhrchen pipettiert.

Zur Trennung dienen ein Festwinkelrotor (Beckman Instr.) FW 40.3 und eine Ultrazentrifuge (Beckman Instr.) L 8-55. Die Zentrifugation dauerte bei 30°C Rotortemperatur und $41.000 \times g$, eine Stunde. Nach Beendigung der Laufzeit wurden der Überstand und die feine oberste, weißliche Schicht abgehoben. Aus der Differenz des jetzigen Gewichts zum Leergewicht des Röhrchens konnte die Schwere der Erythrozytensäule ermittelt und wieder rechnerisch in Fraktionen von 10%, 80% sowie 10% eingeteilt werden. Diese Fraktionen wurden dann unter Gewichtskontrolle mit einer Kolbenhubpipette abgehoben, in Perfusionslösung pipettiert und auf Volumina von 3 ml, 25 ml, sowie 3 ml aufgefüllt. Daraus wurden die unter 2.4. genannten Parameter bestimmt.

Daran anschließend wurden die roten Blutzellen in glucosehaltiger Stammlösung bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.3. Trennung von Rattenerythrozyten mit dem Elutriationsrotor

2.3.1. Verwendete Geräte und Materialien

Als Rotor wurde ein Beckman Elutriator Rotor JE-6 sowie eine Kühlzentrifuge J-21 von Beckman benutzt. Die Zentrifuge war mit einer abgeänderten Haube, einem Stroboskop-einsatz, photooptischer Drehzahlmessung und digitaler Anzeige ausgerüstet. Als Elutriationsflüssigkeit wurde auf $+4^{\circ}\text{C}$ vorgekühlte physiologische Kochsalzlösung verwendet.

2.3.1.1 Aufbau der Elutriationsapparatur

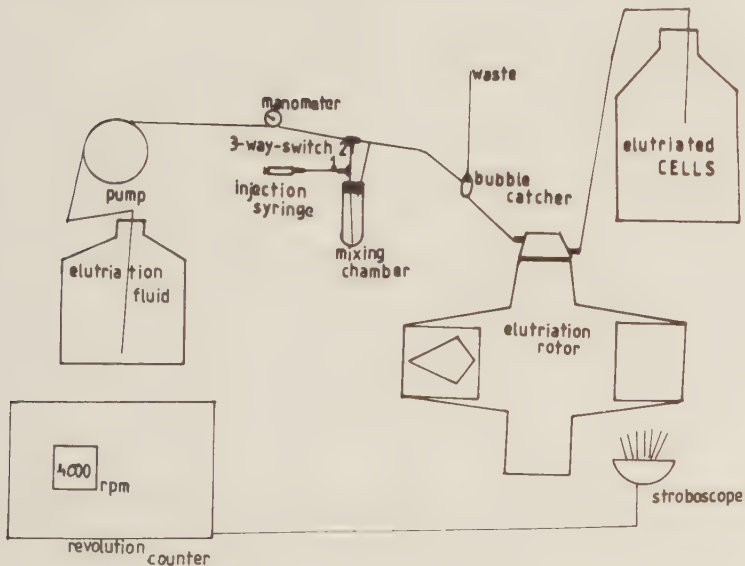


Abb.5: Skizze der Elutriationsapparatur

2.3.1.2 Aufbau des Rotors JE-6

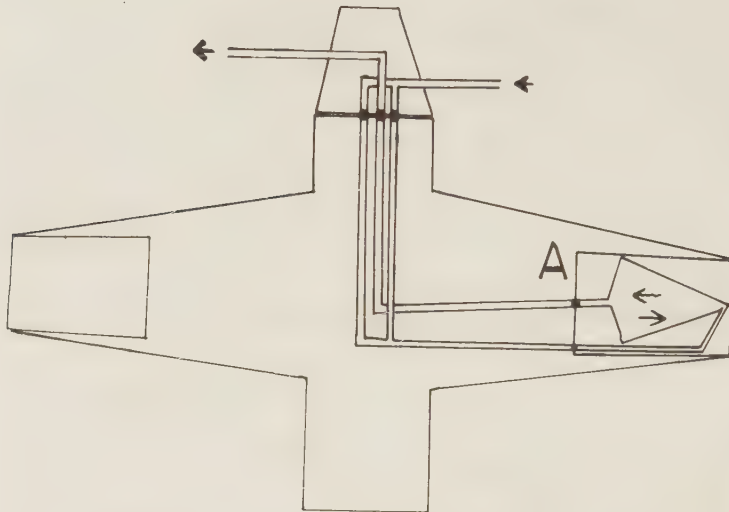


Abb.6: Skizze des Rotors JE-6 (Beckman Instr.)
mit Trennkammer (A).

Oberer Pfeil in der Trennkammer: Richtung
des Flüssigkeitsstromes; unterer Pfeil:
Richtung der Zentrifugalkraft.

2.3.2. Durchführung der Trennung von Rattenerythrozyten

2.3.2.1 Vorbereitung der Elutriationsapparatur

Vom Vorratsgefäß aus wurde auf $+4^{\circ}\text{C}$ gekühlte physiologische Kochsalzlösung von der Pumpe durch das Manometer, den Dreiwegehahn 2 und den Blasenfänger in den Rotor befördert. Im Rotor selbst fließt die Lösung vom Zulauf durch die Achse zur Trennkammer und weiter gegen die Zentrifugalkraft zur Rotormitte hin. Nach Passieren der Nebenschlußkammer und

des Abflusses aus dem Rotor wurde die Salzlösung über einen Dreiwegehahn (nicht verzeichnet) wieder in das Vorratsgefäß zurückgeleitet.

2.3.2.2 Elutriation

Nach dem Einstellen der Betriebsbedingungen, einer Rotortemperatur von $+4^{\circ}\text{C}$, einer Umdrehungszahl von 4000 pro Minute und einer Flowrate von 9 ml/min durch die Rollpumpe, wurde die Mischkammer mit den zu trennenden Erythrozyten (s. 2.1.8.) über den Spritzenanschluß im Dreiwegehahn 1 geladen. Durch Umstellen des Dreiwegehahns 2 konnte der Strom der Elutriationsflüssigkeit dann über die Mischkammer mit den Erythrozyten geleitet werden. Dabei wurden die roten Blutzellen ausgeschwemmt. Sie wanderten in die Trennkammer, wo sie sich, bedingt durch den geringen Flow, anreicherten.

Das Laden der Trennkammer erfolgte bis zu einer festgelegten Markierung und dauerte zwischen 10 und 15 Minuten.

Nach Beendigung der Füllung der Trennkammer wurde die Mischkammer durch den Dreiwegehahn 2 wieder aus der Zirkulation der physiologischen Kochsalzlösung ausgeschlossen. Bei der so entstandenen Packungsdichte der Erythrozyten in der Trennkammer mußte bis zur Gleichgewichtseinstellung der Erythrozyten einige Zeit gewartet werden. Als Trennzeit wurden hier 30 Minuten festgelegt. Nach Ablauf dieser Zeit konnte durch Erhöhung der Flowrate eine beliebige Fraktion an roten Blutzellen ausgespült werden. Die dazu einzustellende Flowrate hängt ab von der Rotordrehzahl, der Größe der gewünschten Fraktion, aber auch von der Menge der Erythrozyten in der Trennkammer.

Die Flußgeschwindigkeit wurde so gewählt, daß wieder Fraktionen von 10%, 80% sowie 10% erzielt wurden. Die getrennten roten Blutzellen wurden in Auffanggefäßen angesammelt und gewogen. Um das bekannte Leergewicht dieser Gefäße vermindert, ergibt sich daraus die Masse der Erythrozytensuspension. Mittels deren spezifischen Gewicht konnte somit das Volumen der Zellsuspension berechnet werden.

Anschließend wurden daraus die unter 2.4. genannten Parameter bestimmt, die Erythrozyten der Fraktionen in einer Beckmann-

Kühlzentrifuge bei $1000 \times g$, $+4^{\circ}\text{C}$ Rotortemperatur für 5 Minuten zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 10 ml Perfusionslösung resuspendiert. Bis zur Weiterverwendung wurden sie in glucosehaltiger Stammlösung bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.3.2.3 Prinzip der Trennung mit dem Elutriationsrotor

In der Trennkammer wirken auf die Erythrozyten eine zur Rotorachse hin gerichtete, durch den Flüssigkeitsstrom hervorgerufene Kraft sowie die von der Rotorachse weg gerichtete Zentrifugalkraft ein. Die Geschwindigkeit des Flüssigkeitsstromes verlangsamt sich durch die sich zur Rotorachse hin öffnende Form der Trennkammer schneller als die Zentrifugalkraft, die auch abnimmt, je mehr sich eine Zelle der Rotorachse nähert. Bei geeigneter Wahl von Umdrehungszahl und Flußrate kommt es in einer bestimmten Entfernung von der Rotorachse für die entsprechende Zelle zur Einstellung eines Kräftegleichgewichts zwischen der Reibungskraft des Flüssigkeitsstromes und der Zentrifugalkraft. Dabei sind Dichte, Größe und Form die Eigenschaften der Teilchen, die ihr Verhalten in der Trennkammer bestimmen. Durch entsprechende Erhöhung des Elutriationsflows können definiert große, beziehungsweise dichte Zellen ausgeschwemmt werden.

2.4. Hämatologische Parameter der getrennten Erythrozyten

2.4.1. Größe der Fraktionen

Durch die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration (siehe 2.1.2.1) und dem jeweils bekannten Volumen der Erythrozytensuspension ließ sich das darin befindliche Hämoglobin in mg bestimmen. Der Anteil in % des Hämoglobins einer Fraktion an der Summe des roten Blutfarbstoffs aller drei Fraktionen, wurde als Größe der Fraktion bezeichnet.

2.4.2. Mittleres korpuskuläres Volumen (MCV)

Eine Probe jeder Fraktion wurde im Coulter Counter ausgezählt

(siehe 2.1.9.2). Das Gerät ermittelte dabei das MCV in μm^3 .

2.4.3. Mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH)

Aus der Hämoglobinkonzentration und der Zellzahl der Probe ließ sich durch Division das MCH in pg errechnen.

2.4.4. Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC)

Die Hämoglobinkonzentration in mg/100 ml Blut dividiert durch das Volumen der Erythrozyten als Bruchteil wurde hier berechnet aus der Division des MCH durch das MCV. Wird das Ergebnis mit 100 multipliziert, so erhält man das MCHC in g Hämoglobin/100 ml Erythrozyten.

2.5. N-Acetylneuraminsäure (NANA)-Bestimmung aus der Membran des Rattenerythrozyten

2.5.1. N-Acetylneuraminsäure-Bestimmung

Sie erfolgte mit der Thiobarbitursäure-Methode nach den Angaben von AMINOFF (3).

2.5.1.1 Reagenzien

Natrium-meta-perjodat:

Natrium-meta-perjodat (NaJO_4 , MG 213,89, Fa.Merck) wurde als 25 mM Lösung auf einen pH von 1,2 eingestellt. Die Einstellung des pH erfolgte mit 0,125 n H_2SO_4 .

Natriumarsenit:

Natrium-meta-arsenit (NaAsO_2 , MG 129,92, Fa.Merck) wurde mit 0,5 n HCl als 2%-ige Lösung hergestellt.

Thiobarbitursäure:

2-Thiobarbitursäure ($\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, MG 162,2, Fa.Serva) wurde als 0,1 molare Lösung mit NaOH auf pH 9 eingestellt. Vor Zugabe von Lauge löste sich die Thiobarbitursäure nur sehr schwer.

Butanol:

Zu n-Butanol wurde 5% rauchende Salzsäure gemischt.

2.5.1.2 Haltbarkeit der Lösungen

NaJO_2 , NaAsO_2 und n-Butanol wurden bei $+4^\circ\text{C}$ aufbewahrt und konnten so einen Monat lang gelagert werden. Die Thiobarbitursäurelösung kann in einer dunklen Flasche ebenfalls einen Monat lang bei $+4^\circ\text{C}$ aufbewahrt werden.

2.5.1.3 Durchführung der Bestimmung

- 0,500 ml der N-Acetylneuraminsäurehaltigen Probe und
0,250 ml der NaJO_4 -Lösung
wurden in einem verschließbaren, hitzebeständigem Gefäß für 30 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von
0,200 ml der NaAsO_2 -Lösung
nimmt das Gemisch einen gelben Farbton an, entfärbt sich aber rasch wieder. Nach Vermischung mit
2,000 ml der Thiobarbitursäurelösung und Inkubation über 7,5 Minuten in einem kochenden Wasserbad erfolgte die schnelle Abkühlung im Eis auf Zimmertemperatur. Der jetzt bereits sichtbare rosa Farbstoff wurde mit
5,000 ml der n-Butanollösung unter kräftigem Schütteln extrahiert. Die Trennung der beiden Phasen wird durch Zentrifugation bei $500 \times g$ für 10 Minuten erleichtert.

2.5.1.4 Messung und Berechnung

Ein Milliliter des Butanols mit dem extrahierten Farbstoff wurde in einem Eppendorf-Photometer bei 546 nm und einer Schichtdicke von 1 cm gegen einen Leerwert gemessen. Als Leerwert diente eine Probe, in der statt einer NANA-haltigen Lösung 0,9%-ige NaCl verwendet worden war, die im übrigen aber den Prozeß der beschriebenen Bestimmung ebenfalls durchlief.

Die Berechnung erfolgte über einen Faktor, der aus einer

vorher angefertigten Eichkurve gewonnen wurde. Die Konzentration der NANA in der Probe in Mikrogramm pro Milliliter errechnete sich aus der Multiplikation der Extinktion mit 52,72.

2.5.2. N-Acetylneuraminsäure-Bestimmung aus Rattenerythrozyten

Aus Gründen der Vergleichbarkeit sollen die Angaben in fg NANA pro Erythrozyt erfolgen.

2.5.2.1 Präparation von Membranen aus Rattenerythrozyten

Die Präparationsmethode lehnte sich an die Angaben von DODGE (30) und FAIRBANKS (35) an.

Als Ausgangspunkt dienten wieder nach 2.1.8.gewonnene und gewaschene Rattenerythrozyten. Davon wurden 0,200 ml in 0,500 ml Stammlösung suspendiert und im Coulter Counter gezählt. Aus dem bekannten Volumen konnte die Gesamtmenge an Erythrozyten berechnet werden.

Zur Hämolyse wurden die Erythrozyten nun mit dem 15-fachen Volumen eines 5 mM Phosphatpuffers versetzt und gemischt. Dieser Puffer bestand aus vier Teilen 5 mM Dinatriumhydrogenphosphat und einem Teil 5 mM Kaliumdihydrogenphosphat. Der pH-Wert wurde auf 7,4 mit 1 N Salzsäure oder 1 N Natronlauge eingestellt.

Zum Abzentrifugieren der hämolysierten Erythrozyten können eine Ultrazentrifuge von Beckman, Typ L 8-55 und ein Ausschwingrotor der gleichen Firma vom Typ SW 40 eingesetzt werden. Bei 20.000 x g und +4⁰C Rotortemperatur betrug die Laufzeit 15 Minuten. Nach der Zentrifugation befand sich am Boden des Zentrifugenröhrchens das locker gepackte, weißliche Pellet der hämolysierten Erythrozyten. Mit einer schwach eingestellten Wasserstrahlpumpe und einer großen Saugöffnung wurde der hämoglobinhaltige Überstand vorsichtig abgesaugt. Als Sicherheitsabstand zum Pellet wurde ein Zentimeter eingehalten.

Dieser Vorgang der hypotonen Hämolyse mit anschließender

Abtrennung des "Überstandes" wurde noch dreimal wiederholt. Danach war der Überstand wasserklar. Das letzte Absaugen erfolgte besonders vorsichtig bis etwa 0,5 cm über das Pellet.

2.5.2.2 Säurehydrolyse der Membranen

Das hier angewandte Verfahren findet sich bei DUROCHER (32). Bei der Säurehydrolyse wird die glykosidische Bindung der endständigen NANA zum nächsten Baustein des Kohlenhydratanteils der membranständigen Glykoproteine durchbrochen (siehe 4.6.2.).

Zu der unter 2.5.2.1 hergestellten Membranpräparation wurden 0,10 ml 0,1 N Schwefelsäure gegeben, gemischt und das Reagenzglas mit einem Stöpsel verschlossen. Die einstündige Inkubation erfolgte unter leichtem Schütteln in einem Wasserbad bei 80°C. Danach wurde im Eisbad auf Raumtemperatur abgekühlt.

2.5.2.3 Neuraminsäurebestimmung

Sie erfolgte wie unter 2.5.1. ausgeführt. Als Probe wurde die nach Säurehydrolyse (siehe 2.5.2.2) bereits im Reagenzglas befindliche Lösung verwandt.

Durch Multiplikation der so gemessenen Konzentration mit dem bekannten Volumen, in das der Farbstoff hinein extrahiert wurde, ergab sich die Gesamtmenge an NANA.

Durch Division mit der ebenfalls bekannten Ausgangszahl an roten Blutzellen, ließ sich die Menge an NANA errechnen, die durch Säurehydrolyse pro Erythrozyt abgespalten werden konnte. Die Angabe erfolgte in fg/RBC.

2.5.2.4 NANA-Bestimmung aus den Membranen aufgetrennter Erythrozyten

Rattenerythrozyten wurden nach den Verfahren von Platt et al. und MURPHY aufgetrennt (siehe 2.2.). Mit den Erythrozyten wurde wie unter 2.5.2. bisher beschrieben, verfahren. Pro Fraktion wurde eine 6fach-Bestimmung durchgeführt.

2.6. Neuraminidasebehandlung und Plasmainkubation von Rattenerythrozyten

2.6.1. Neuraminidaseinkubation

Ausgangspunkt bildeten Rattenerythrozyten, die nach 2.1.8. gewonnen wurden. Aus 6,60 ml Stammlösung und 2,00 ml gepackten Rattenerythrozyten wurde eine Suspension hergestellt und im Coulter Counter gezählt. Durch Multiplikation dieser Erythrozytenkonzentration mit dem bekannten Gesamtvolumen ergab sich die Gesamtzahl an Rattenerythrozyten der Probe. Nach Zugabe von 0,40 ml Test-Neuraminidase betrug das Volumen des Ansatzes 9,00 ml. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten unter sanftem Schütteln bei 37°C im Wasserbad.

Bei der verwendeten Test-Neuraminidase handelte es sich um die N-Acyl-neuraminyglyko-Hydroxylase aus *Vibrio comma* der Firma Behring. Das Enzympräparat weist laut Firmenangabe unter Standardbedingungen eine Aktivität von 1 U/ml auf.

Die Aktivität der Neuraminidase im Ansatz betrug demnach 0,044 U/ml Inkubationsansatz oder 0,022 U/ml gepackter Rattenerythrozyten. Die eingesetzten Enzymaktivitäten folgten also in ihrer Höhe den Angaben von AMINOFF (4) und BALDUINI (6).

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde bei 1000 x g 5 Minuten lang abzentrifugiert, der Überstand abgehoben und gemäß 2.5.1. daraus die Konzentration der NANA bestimmt. Zum Auswaschen der Enzyme und damit zur Unterbrechung der weiteren Einwirkung auf die Membran wurden die Erythrozyten mit 0,9%-iger NaCl gewaschen (siehe 2.1.8.) und in glucosehaltiger Stammlösung bei +4°C bis zur Weiterverwendung aufbewahrt.

2.6.2. Berechnung der abgespalteten Menge an NANA pro Erythrozyt

In 0,5 ml des Überstandes nach Inkubation mit Neuraminidase wurde gemäß 2.5.1. die Konzentration an NANA bestimmt. Aus dem bekannten Volumen des Inkubationsansatzes wurde daraus

die Gesamtmenge an enzymatisch abgetrennter NANA errechnet. Durch Division mit der ebenfalls bekannten Menge der eingesetzten Erythrozyten konnte die pro roter Blutzelle (RBC) abgespaltete Menge an NANA (fg/RBC) ermittelt werden.

2.6.3. Plasmainkubation

2.6.3.1 Gewinnung von Rattenplasma

Bei der unter 2.1.8. beschriebenen Entnahme von Rattenblut befand sich in den ersten 10 ml noch wenig zugemischte Stammlösung. Dies wurde nach 5 Minuten langer Zentrifugation bei 1000x g kenntlich. Das Blut trennte sich zu etwa gleichen Teilen in Überstand und Erythrozyten. Dieser Überstand aus nur wenig verdünntem Plasma wurde abgenommen und bis zur Inkubation mit den roten Blutzellen am nächsten Tag bei +4°C aufbewahrt.

2.6.3.2 Plasmainkubation von Rattenerythrozyten

Für die Inkubation wurde erythrozytenautologes Plasma eingesetzt. Sie fand einen Tag nach Gewinnung von Plasma und Erythrozyten statt, unmittelbar vor der Perfusion. Der Inkubationsansatz bestand aus:

- 0,60 ml gepackter Rattenerythrozyten und
- 1,80 ml autologem Plasma.

Die Inkubation erfolgte eine Stunde lang unter sanftem Schütteln in einem Wasserbad bei 37°C.

Eine Gerinnung trat wegen des vor der Operation (siehe 2.1.2.) und bei der Gewinnung der Rattenerythrozyten (siehe 2.1.8.) zugefügten Heparins nicht ein. Die Vorschrift zur Plasmainkubation wurde den Angaben von JANCİK (58) entnommen.

Nach Beendigung der Inkubation wurde das Plasma durch Zentrifugation bei 1000 x g für 5 Minuten abgetrennt, die Erythrozyten, wie unter 2.1.8. beschrieben, gewaschen und sofort perfundiert.

2.6.4. Kontrollgruppe

Zum Ausschluß präparationsbedingter, bei der Perfusion sich auswirkender Veränderungen an den Membranen der roten Blutzellen wurde eine Kontrollgruppe gebildet. Wie unter 2.6.1. und 2.6.3. beschrieben, wurden Rattenerythrozyten behandelt, mit dem Unterschied jedoch, daß statt Neuraminidase bei 2.6.1. eine entsprechende Menge physiologischer Kochsalzlösung eingesetzt wurde.

2.7. Statistische Auswertung

2.7.1. Verwendete statistische Funktionen (76, 105)

Mittelwert:

Der Mittelwert $\bar{x}$ wird als arithmetisches Mittel nach der Formel

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad /1/$$

berechnet.

Standardabweichung:

Die Standardabweichung einer Stichprobe läßt sich aus der Gleichung

$$S_x = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}} \quad /2/$$

ermitteln.

Lineare Regression:

Die Regressionsgrade $y = Ax + B$ wird durch folgende Ausdrücke für A und B definiert:

$$A = \frac{n \sum x \cdot y - \sum x \cdot \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad B = \frac{\sum y \sum x^2 - \sum x \sum x \cdot y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad /3/$$

Korrelationskoeffizient:

Der Korrelationskoeffizient r ergibt sich aus der Formel

$$r = \pm \sqrt{\frac{\text{erklärte Streuung}}{\text{totale Streuung}}} = \pm \sqrt{\frac{\sum (\hat{y} - \bar{y})^2}{\sum (y - \bar{y})^2}} \quad /4/$$

wobei es sich bei $\hat{y}$ also um den linearen Schätzwert der Regressionsgeraden handelt.

2.7.2. Signifikanztest (76, 105)

Bei den hier zu betrachtenden Stichproben handelte es sich

um sogenannte "kleine" Stichproben, die in ihrem Umfang unter 30 liegen. Als Stichprobenfunktion wird deshalb die Student's t-Verteilung herangezogen.

Zwei Stichproben vom Umfang n_1 und n_2 aus angenommenen normalverteilten Grundgesamtheiten mit den Mittelwerten $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ sowie den Standardabweichungen s_1 und s_2 werden miteinander verglichen.

Die Nullhypothese H_0 lautet: $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$, der beobachtete Unterschied ist zufallsbedingt.

Die Gegenhypothese H_1 lautet: $\bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$, der beobachtete Unterschied ist nicht zufallsbedingt.

Als Entscheidungsgrundlage gilt der Zentilwert t des jeweiligen Freiheitsgrades v :

$$v = n_1 + n_2 - 2 \quad /5/$$

Die Zentilwerte t errechnen sich aus:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad /6/$$

wobei
$$\sqrt{\frac{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad /7/$$

ist.

v	$t_{0,995}$	$t_{0,975}$
5	4,03	2,57
8	3,36	2,31
10	3,17	2,23
14	2,98	2,14
18	2,88	2,10

Tabelle 1: Zentilwert t für die wichtigsten, bei der statistischen Auswertung vorkommenden Freiheitsgrade v (105) der Student's t-Verteilung.

Bei einem Signifikanzniveau von 0,05 wird H_0 angenommen, wenn t (Gleichung 6) kleiner oder gleich $t_{0,975}$ (zweiseitiger Test) ist. Ist t jedoch größer, so wird die Nullhypo-

diese verworfen und ein signifikanter Unterschied angenommen. Für eine Irrtumswahrscheinlichkeit unter 1 % werden entsprechend die Werte für $t_{0,995}$ verwendet.

2.7.3. Auswertung der Meßwerte für das Gesamthämoglobin

Das Gesamthämoglobin (Hb_{ges}), ein Gradmesser für Phagozytose und Adhärenz (siehe 4.2.1.), wurde als Konzentration in mg/100 ml gemessen. Die Ausgangskonzentration für alle Versuche wurde möglichst konstant gehalten. Durch die Verwendung täglich frisch angesetzter Erythrozytensuspensionen sowie durch die Abhängigkeit von Vorversuchen (beispielsweise der Fraktionsgröße bei Trennungen) konnte dies nur annähernd erreicht werden. Bei 74 Perfusionen mit Rattenerythrozyten betrug der Ausgangswert für Hb_{ges} $41,12 \pm 7,15$ mg/100 ml.

Die tabellarischen Angaben für Hb_{ges} beziehen sich jedoch auf den jeweiligen Ausgangswert des Versuchs. Diese Art der Angabe in Relativwerten wird in der Literatur (29, 40, 60, 83) bevorzugt und soll der besseren Vergleichbarkeit wegen auch hier Verwendung finden.

Der Relativwert für das Gesamthämoglobin (Hb_{ges}) in % des Ausgangswertes des jeweiligen Versuchs berechnet sich wie folgt:

$$\frac{Hb_{ges} \text{ (in mg/100 ml) zur Zeit } t}{Hb_{ges} \text{ (in mg/100 ml) zur Zeit } t_0 = 1'} \times 100 \quad /8/$$

Die statistischen Aussagen beziehen sich ebenfalls, wenn nicht anders vermerkt, auf die relativen Werte.

Für die Phagozytose von Kohlepartikel am intakten Tier wurde folgender Zusammenhang zwischen dem Phagozytosekoeffizienten k und der Ausgangskonzentration D angegeben (16,46):

$$k \times D = \text{konstant} \quad /9/$$

Große Unterschiede in den Ausgangskonzentrationen würden also andere Phagozytosekoeffizienten und damit einen anderen Kurvenverlauf der Phagozytose ergeben.

Die hier vorkommenden Unterschiede der Ausgangskonzentrationen waren gering genug, um auftretende Fehler dieser Art zu vermeiden.

2.8. Versuchsplän (siehe Tabelle 2)

2.8.1. Absicherung der Methoden

2.8.1.1 Hämoglobinfreie Leberperfusionsen (Serie I)

Es handelt sich dabei um Leberperfusionsen, bei denen dem Perfusionsmedium keine Erythrozyten zugesetzt wurden.

2.8.1.2 Leerperfusionsen (Serie II und XVI)

Der Perfusionslösung wurden Erythrozyten zugesetzt, Rattenerythrozyten für Serie II, menschliche rote Blutzellen für Serie XVI, doch wurde keine Rattenleber angeschlossen. Über den Pfortaderkatheter gelangte das Perfusionsmedium direkt in das Vorratsgefäß für die zyklische Perfusion.

2.8.1.3 Perfusion hämolysierter Erythrozyten (Serie III)

Es wurden homologe Rattenerythrozyten gewonnen und gewaschen (siehe 2.1.8.). Zu der für eine Perfusion benötigten Erythrozytenmenge wurden 5 ml destilliertes Wasser pipettiert und dadurch eine nahezu komplette Hämolyse herbeigeführt.

Das Perfusionsmedium setzte sich aus 5,5 ml Suspension hämolysierter Erythrozyten und 144,5 ml Stammlösung zusammen.

2.8.1.4 Perfusion mit autologen (Serie V) und homologen (Serie VI) Erythrozyten

Autologe Erythrozyten wurden während der Operation gewonnen (siehe 2.1.8.) und sofort für die Perfusion der präparierten Leber verwendet.

Homologe Erythrozyten wurden eine Nacht bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert (siehe 2.1.8.) und am nächsten Tag bei der Perfusion der Leber einer anderen Ratte verwendet. Das Lagern über Nacht wurde bei allen Versuchen mit roten Blutzellen eingehalten, mit Ausnahme der Perfusionsen von autologen Erythrozyten.

Serie	Zusatz zum Perfusionsmedium	n	Absicherung der Methoden	Art der Ery- throzyten	Alterung in vitro	Alterung in vivo
I	kein Zusatz, hämoglobinfrei	2	x			
Rattenerythrozyten						
II	ohne Leber	5	x			
III	hämolyisiert	2	x		x	
IV	glutaraldehydfixiert	2			x	
V	autolog	10	x	x		
VI	homolog	10	x	x		
VII	plasmainkubiert	6			x	
VIII	neuraminidaseinkubiert	6			x	
IX	neuraminidase- und plasmainkubiert	6			x	
X	Dichtentrennung, obere Fraktion	6				x
XI	Dichtentrennung, mittlere Fraktion	6				x
XII	Dichtentrennung, untere Fraktion	6				x
XIII	Gegenstromtrennung, erste Fraktion	6				x
XIV	Gegenstromtrennung, zweite Fraktion	6				x
XV	Gegenstromtrennung, dritte Fraktion	6				x
Menschliche Erythrozyten						
XVI	ohne Leber	5	x			
XVII	Blutgruppe 0, rhesus negativ	7		x		

Tabelle 2: Plan der durchgeführten Perfusionsserien

n: Anzahl der durchgeführten Versuche

2.8.1.5 Perfusion plasmainkubierter Rattenerythrozyten
(Serie VII)

Es handelt sich dabei um die Kontrollgruppe für 2.8.3.3 (siehe 2.6.4).

2.8.2 Perfusion von Erythrozyten unterschiedlicher Herkunft

2.8.2.1 Perfusion menschlicher Erythrozyten (Serie XVII)

Menschliches Blut der Blutgruppe 0, Rhesus negativ, wurde abgenommen und mit einem Teil Natriumheparinat (Liquemin 25.000^R) auf neun Teile Blut ungerinnbar gemacht. Es wurde, wie unter 2.1.8.8 beschrieben, behandelt und am nächsten Tag perfundiert.

2.8.2.2 Perfusion autologer und homologer Rattenerythrozyten
siehe 2.8.1.4.

2.8.3 Alterierung in vitro

2.8.3.1 Perfusion hämolysierter Rattenerythrozyten' (Serie III)
siehe 2.8.1.3.

2.8.3.2 Perfusion glutaraldehydfixierter Rattenerythrozyten
(Serie IV)

Zu einem Teil Glutaraldehydlösung (Fa. Merck, 25 %ig) wurden neun Teile Perfusionslösung gemischt ($\cong$ 2,5% Glutardialdehydlösung). Die in üblicher Weise gewonnenen Rattenerythrozyten wurden bei +4⁰C über 24 Stunden mit der Fixierlösung inkubiert. Dabei wurden zu einem Milliliter gepackter Zellen 10 ml 2,5%ige Glutaraldehydlösung gegeben.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die fixierten Erythrozyten 3 mal gewaschen.

2.8.3.3 Perfusion von Rattenerythrozyten nach Inkubation mit Neuraminidase (Serie VIII und IX)

Neuraminidaseinkubierte Erythrozyten wurden, wie unter 2.6.1 daruelegt, präpariert und danach, wie unter 2.6.3 beschrieben, mit Plasma (Serie IX) oder nur mit physiologischer Kochsalz-

lösung (Serie VIII) inkubiert.

Als Kontrollgruppe (Serie VII) diente die Präparation nach 2.6.4.

2.8.4 Alterung in vivo

2.8.4.1 Perfusionen von nach der Methode von MURPHY getrennten Rattenerythrozyten (Serie X, XI, XII)

Erythrozyten wurden wie unter 2.2.2 beschrieben getrennt. Als Serie X wurden die oberen 10%, als XI Erythrozyten der mittleren 80%, als XII die unteren 10% perfundiert.

2.8.4.2 Perfusionen von mit dem Elutriationsrotor getrennten Rattenerythrozyten (Serie XIII, XIV, XV)

Rattenerythrozyten wurden wie unter 2.3 angeführt getrennt. Dabei entsprachen den roten Blutzellen der ersten Fraktion die Serie XIII, der zweiten Fraktion die Serie XIV, der dritten Fraktion die Serie XV.

3. Resultate

3.1. Biochemische Kontrollparameter

Zur Absicherung der Methode der Leerperfusion für die Erythrozytenphagozytose sowie zur Charakterisierung der Stoffwechsellaage des isolierten Organs wurden die unter 2.1.10 genannten Messungen biochemischer Kontrollparameter durchgeführt.

Hierzu lassen sich prinzipiell drei Versuchsanordnungen unterscheiden: Versuche ohne Leber, mit Erythrozyten (hier als Leerperfusionen bezeichnet: Gruppe A); Versuche mit Leber, jedoch ohne Zusatz von Erythrozyten (hämoglobinfreie Leberperfusionen: Gruppe B); Versuche mit dem isolierten Organ und Erythrozyten (Gruppe C).

Zur Gruppe A werden die Serien II und XVI mit einem Umfang von 10 Experimenten gerechnet, zur Gruppe B die Serie I mit 2 Experimenten. Gruppe C umfaßt die eigentlichen Phagozytosexperimente, die Serien III-XV sowie Serie XVII, mit insgesamt 85 Experimenten.

Die drei genannten Versuchsgruppen sollen im folgenden anhand der biochemischen Kontrollparameter einander gegenübergestellt werden.

3.1.1. Kalium

Wie aus Tabelle 3 und Abb. 7 ersichtlich wird, blieb in der Gruppe der Leerperfusionen (A) die Kaliumkonzentration im Perfusionsmedium konstant. Bei den Leberperfusionen (B und C) stieg sie während der Perfusionszeit an, in Gruppe B stärker als in Gruppe C. Statistisch findet sich jedoch kein Unterschied.

3.1.2. Glucose

Der Tabelle 4 kann für Gruppe A eine weitgehende Konstanz der Glucosekonzentration entnommen werden. Der Glucoseverbrauch der Erythrozyten im Perfusat führte zu keiner meßbar großen Änderung. Für die Gruppen der Leberperfusionen (B und C) hingegen läßt sich eine kontinuierliche Zunahme der Glucosekonzentration feststellen (siehe auch 3.1.10).

Entnahme- zeiten (Minuten)		G r u p p e		
		A	B	C
1	$\bar{x}$	6,00	5,85	5,83
	s	0,15	0,22	0,24
20	$\bar{x}$	5,96	6,13	5,79
	s	0,11	0,82	0,34
40	$\bar{x}$	5,97	6,37	5,80
	s	0,12	0,89	0,40
60	$\bar{x}$	6,00	6,45	5,87
	s	0,08	0,92	0,52
80	$\bar{x}$	5,99	6,31	5,96
	s	0,11	0,74	0,99
100	$\bar{x}$	6,00	6,46	6,12
	s	0,11	0,79	0,72
120	$\bar{x}$	6,01	6,42	6,27
	s	0,10	0,62	0,80

Tabelle 3: Kaliumkonzentration in mval/l (Mittelwert $\bar{x}$, Standardabweichung s) der jeweiligen Gruppe (A: Leerperfusionen, B: Hämoglobinfreie Leberperfusionen, C: Leberperfusionen mit Erythrozyten).

Entnahme- zeiten (Minuten)		G r u p p e		
		A	B	C
1	$\bar{x}$	5,34	5,05	4,61
	s	0,36	0,15	1,18
20	$\bar{x}$	5,40	5,88	4,99
	s	0,53	0,78	1,40
40	$\bar{x}$	5,53	6,70	5,41
	s	0,56	1,18	1,56
60	$\bar{x}$	5,50	7,28	5,62
	s	0,30	2,11	1,78
80	$\bar{x}$	5,33	7,36	5,86
	s	0,63	2,30	1,87
100	$\bar{x}$	5,19	7,77	6,15
	s	0,30	2,59	2,05
120	$\bar{x}$	5,52	7,99	6,38
	s	0,33	2,90	2,21

Tabelle 4: Glucosekonzentration in mmol/l (Mittelwert $\bar{x}$, Standardabweichung s) der jeweiligen Gruppe (A: Leer - perfusionen, B: Hämoglobinfreie Leberperfusion, C: Leberperfusionen mit Erythrozyten).

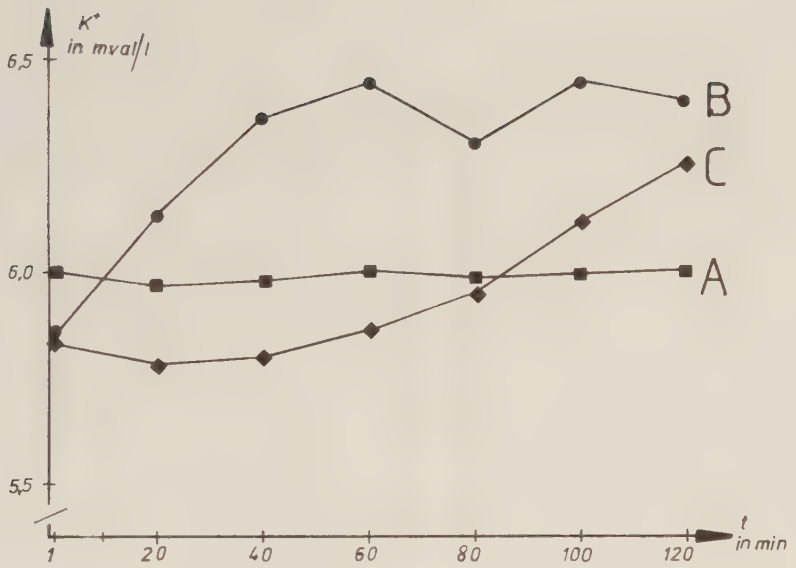


Abb. 7: Kaliumkonzentrationen im Perfusat in mval/l; Mittelwerte der Gruppen A, B, C (Standardabweichungen siehe Tabelle 3).

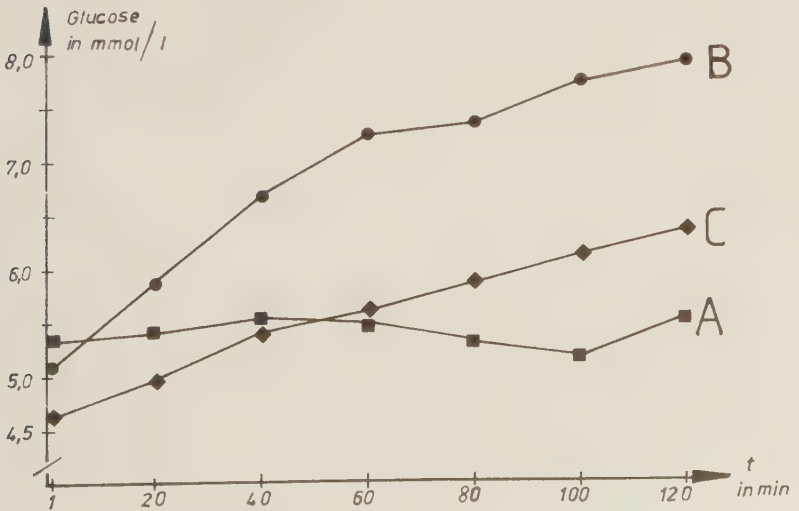


Abb. 8: Glucosekonzentrationen im Perfusat in mmol/l; Mittelwerte der Gruppen A, B, C (Standardabweichungen siehe Tabelle 4).

3.1.3. GOT und GPT

Entnahmezeiten (Minuten)		G r u p p e		
		A	B	C
1	$\bar{x}$	2,0	2,7	2,7
	s	0,54	1,20	1,09
40	$\bar{x}$	2,0	3,5	7,7
	s	0,54	0,00	2,70
80	$\bar{x}$	2,0	6,2	11,3
	s	0,54	1,27	5,21
100	$\bar{x}$	2,0	7,1	14,4
	s	0,54	2,47	4,77
120	$\bar{x}$	2,7	8,0	17,1
	s	0,90	3,75	7,20

Tabelle 5: Glutamat-Oxalacetat-Transaminaseaktivitäten in U/l (Mittelwert $\bar{x}$, Standardabweichung s) der jeweiligen Gruppe (A: Leerperfusionen, B: Hämoglobinfreie Leberperfusionen, C: Leberperfusionen mit Erythrozyten).

Die Tabellen 5 und 6 geben die Beobachtung wieder, daß bereits ohne Leber (A) gleichbleibende Aktivitäten der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) von etwa 2,0 U/l gemessen wurden. Vor allem wegen ihrer geringen Konzentration im Perfusionsmedium (etwa 1/500 jener des Vollblutes) und ihres relativ geringen Gehalts an Transaminasen können die Erythrozyten als Ursache dieser basalen Enzymaktivitäten vernachlässigt werden. Durch Messung der Transaminasen im Perfusat mit fast hämolysierten Erythrozyten (Serie III, in dieser Arbeit nicht eigens aufgeschlüsselt) konnte dies ebenfalls demonstriert werden.

Die bei den Leerperfusionen gefundenen Aktivitäten müssen also als systematische Meßungenauigkeit berücksichtigt werden.

Entnahmezeiten (Minuten)		G r u p p e		
		A	B	C
1	$\bar{x}$	2,0	1,8	2,2
	s	0,54	0,00	1,05
40	$\bar{x}$	1,8	1,8	5,4
	s	0,83	0,00	3,11
80	$\bar{x}$	2,0	3,5	6,7
	s	0,54	0,0	3,97
100	$\bar{x}$	1,8	3,5	7,4
	s	0,00	0,00	4,28
120	$\bar{x}$	2,0	6,15	9,2
	s	0,54	3,75	6,42

Tabelle 6: Aktivitäten der Glutamat-Pyruvat-Transaminase in U/l (Mittelwert $\bar{x}$, Standardabweichung s) der jeweiligen Gruppe (A: Leerperfusion, B: Hämoglobinfreie Leberperfusion, C: Leberperfusion mit Erythrozyten).

Bei den Leberperfusionen (B und C) dagegen kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Enzymaktivitäten, wobei die Experimente mit Erythrozyten (C) teilweise signifikant höhere Werte aufwiesen als jene ohne Erythrozyten (B). Bei beiden Gruppen lagen die Werte für GOT etwa 40% über denen von GPT.

3.1.4. Lactat

Die Ausgangskonzentrationen an Lactat (siehe Tabelle 7) entsprachen der dem Perfusionsmedium zugesetzten Milchsäuremenge. Während für die Leerperfusionen (A) die Konzentrationen während der Versuchszeit konstant blieben, stiegen bei den Leberperfusionen die Werte an. Ab 60 Minuten kam es zwischen den Gruppen der Leberperfusionen (B und C) zu signifikant unterschiedlichen Ergebnissen. In der Gruppe C wurden innerhalb der zwei Perfusionsstunden insgesamt 20,98 μmol Lactat pro Gramm Leberfrischgewicht freigesetzt (siehe 3.1.10.)

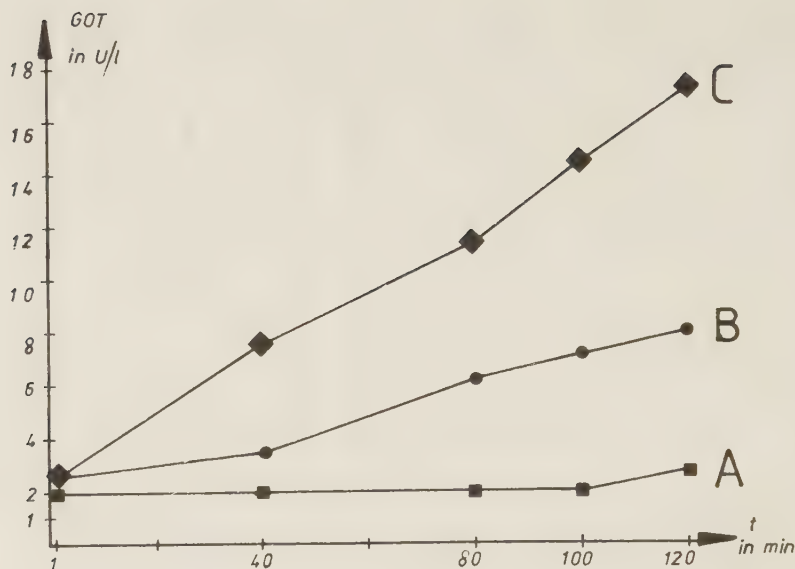


Abb.9: GOT - Aktivitäten im Perfusat in U/l;
Mittelwerte der Gruppen A, B, C (Standard-
abweichungen siehe Tabelle 5).

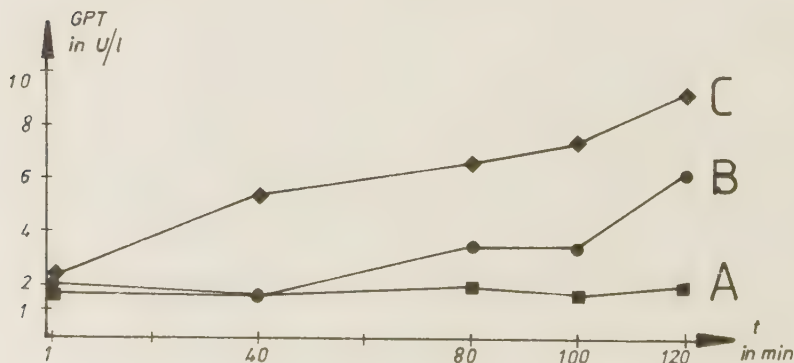


Abb.10: GPT - Aktivitäten im Perfusat in U/l;
Mittelwerte der Gruppen A, B, C (Standard-
abweichungen siehe Tabelle 6).

Entnahme- zeiten (Minuten)		G r u p p e		
		A	B	C
1	$\bar{x}$	23,33	19,17	23,04
	s	2,96	0,58	6,37
20	$\bar{x}$	23,28	23,07	30,01
	s	2,05	3,11	5,89
40	$\bar{x}$	23,62	25,08	36,53
	s	2,39	1,63	8,62
60	$\bar{x}$	23,54	25,21	42,85
	s	2,95	5,67	12,02
80	$\bar{x}$	23,52	29,24	47,32
	s	3,13	3,03	15,58
100	$\bar{x}$	23,92	31,11	51,21
	s	3,01	7,18	19,09
120	$\bar{x}$	23,68	29,64	54,43
	s	2,95	8,90	22,42

Tabelle 7: Lactatkonzentrationen in mg/100 ml (Mittelwert $\bar{x}$, Standardabweichung s) der jeweiligen Gruppe (A: Leerperfusion, B: Hämoglobinfreie Leberperfusion, C: Leberperfusion mit Erythrozyten).

3.1.5. Pyruvat

Auch für Pyruvat (siehe Tabelle 8) entsprachen die Anfangskonzentrationen den im Perfusionsmedium enthaltenen Pyruvat.

Während bei den Leerperfusionsen (A) diese Meßwerte konstant blieben, sanken die Werte bei den Leberperfusionsen (B und C) innerhalb der ersten 20 Minuten ab, um dann bis zum Ende der Perfusion wieder den Ausgangsstand zu erreichen.

Zwischen den Gruppen B und C ließ sich kein statistisch aussagekräftiger Unterschied ermitteln.

Entnahme- zeiten (Minuten)		G r u p p e		
		A	B	C
1	$\bar{x}$	3,25	3,54	2,90
	s	0,17	1,04	0,66
20	$\bar{x}$	3,30	2,85	2,16
	s	0,24	0,91	0,82
40	$\bar{x}$	3,25	2,95	2,26
	s	0,13	0,89	0,83
60	$\bar{x}$	3,25	3,18	2,39
	s	0,15	0,26	0,85
80	$\bar{x}$	3,29	3,39	2,60
	s	0,12	0,31	0,84
100	$\bar{x}$	3,29	3,66	2,77
	s	0,15	0,44	0,92
120	$\bar{x}$	3,28	3,66	2,87
	s	0,14	0,44	0,10

Tabelle 8: Pyruvatkonzentrationen in mg/100 ml (Mittelwert $\bar{x}$, Standardabweichung s) der jeweiligen Gruppe (A: Leerperfusion, B: Hämoglobinfreie Leberperfusion, C: Leberperfusion mit Erythrozyten)

3.1.6. Beta-Hydroxybutyrat

Während bei den Leerperfusionsen (A) kein Beta-Hydroxybutyrat nachweisbar war, stiegen die Konzentrationen bei den Leberperfusionsen (B und C) kontinuierlich an, in der Gruppe C stärker als in Gruppe B; eine Signifikanz ließ sich nicht nachweisen (siehe Tabelle 9).

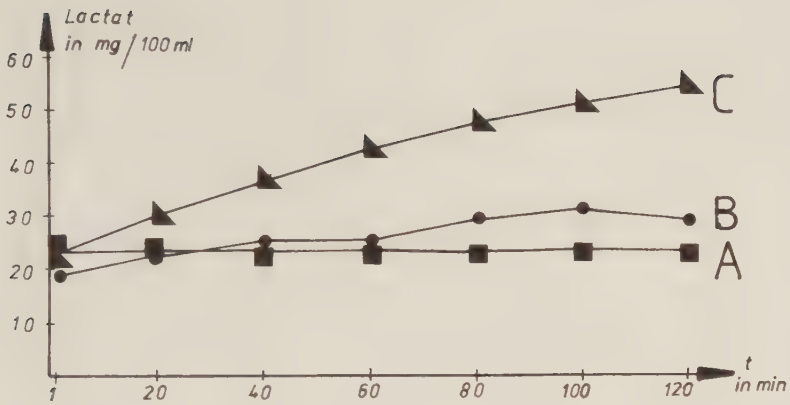


Abb. 11: Lactatkonzentrationen im Perfusat in mg/100 ml; Mittelwerte der Gruppen A, B, C (Standardabweichungen siehe Tabelle 7).

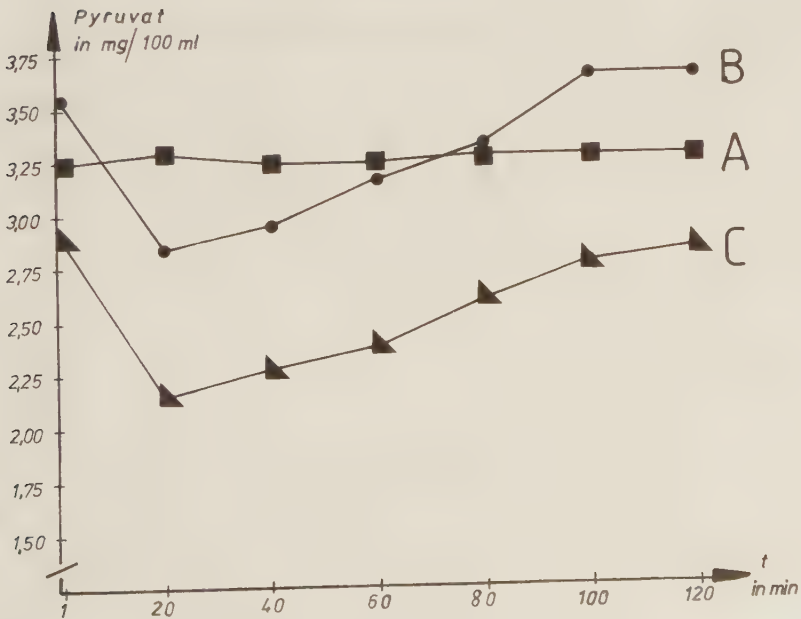


Abb. 12: Pyruvatkonzentrationen im Perfusat in mg/100 ml; Mittelwerte der Gruppen A, B, C (Standardabweichungen siehe Tabelle 8).

Entnahmezeiten (Minuten)		G r u p p e		
		A	B	C
1	$\bar{x}$	0,09	0,10	0,13
	s	0,04	0,00	0,08
20	$\bar{x}$	0,05	0,28	0,46
	s	0,08	0,06	0,10
40	$\bar{x}$	0,05	0,36	0,93
	s	0,06	0,10	0,47
60	$\bar{x}$	0,05	0,68	1,67
	s	0,06	0,09	0,63
80	$\bar{x}$	0,07	1,13	2,66
	s	0,07	0,40	1,12
100	$\bar{x}$	0,07	2,70	3,75
	s	0,10	0,52	1,59
120	$\bar{x}$	0,08	2,67	5,07
	s	0,08	1,53	2,14

Tabelle 9: Beta-Hydroxybutyrat-Konzentrationen in mg/100 ml (Mittelwert $\bar{x}$, Standardabweichung s) der jeweiligen Gruppe (A: Leerperfusion, b: Hämoglobinfreie Leberperfusion, C: Leberperfusion mit Erythrozyten).

3.1.7. Acetoacetat

Während auch hier die Werte der Leerperfusionen (A) unter 0,2 mg/100 ml lagen, stiegen die Konzentrationen bei den Leberperfusionen (B und C) in gleicher Weise an (siehe Tabelle 10).

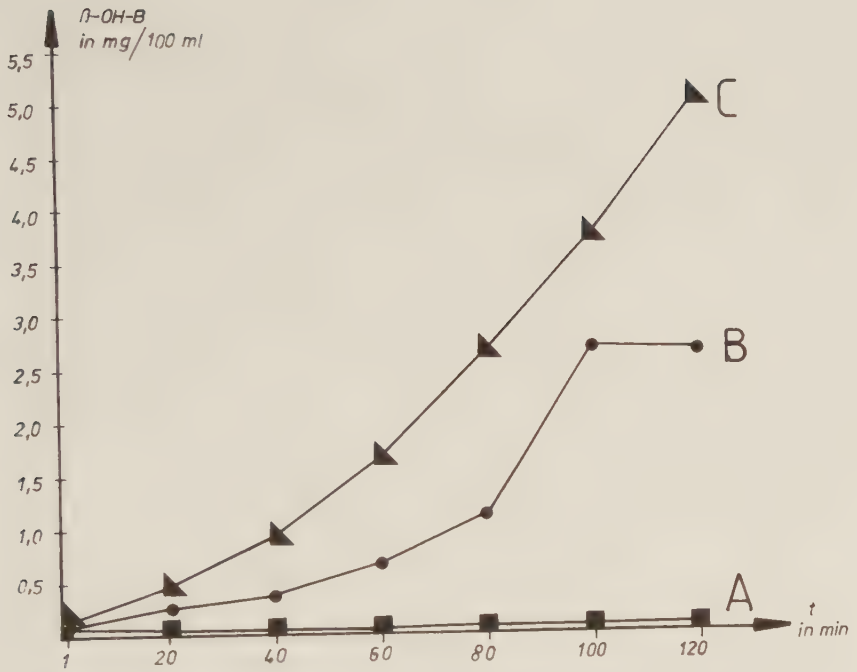


Abb. 13: Konzentrationen von Beta-Hydroxybutyrat (Beta-OH-B) in mg/100 ml; Mittelwerte der Gruppen A,B,C (Standardabweichungen siehe Tabelle 9).

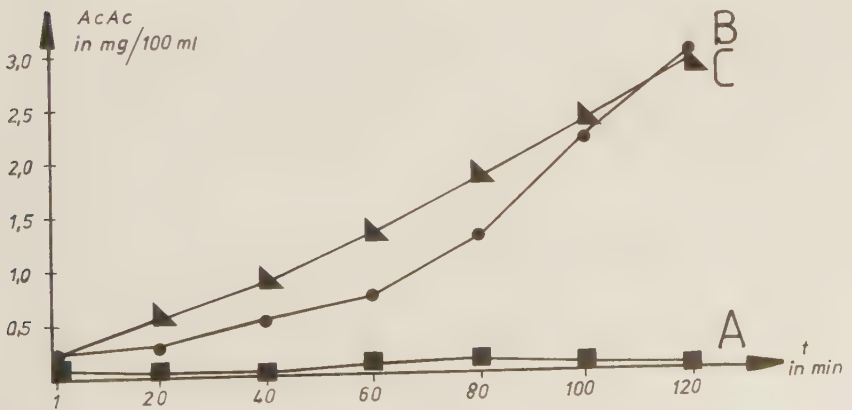


Abb. 14: Acetoacetat-Konzentrationen (AcAc) in mg/100 ml; Mittelwerte der Gruppen A,B,C (Standardabweichungen siehe Tabelle 10)

Entnahme- zeiten (Minuten)		G r u p p e		
		A	B	C
1	$\bar{x}$	0,09	0,22	0,22
	s	0,14	0,11	0,25
20	$\bar{x}$	0,04	0,30	0,52
	s	0,08	0,31	0,29
40	$\bar{x}$	0,02	0,51	0,88
	s	0,09	0,22	0,46
60	$\bar{x}$	0,09	0,73	1,31
	s	0,09	0,45	0,66
80	$\bar{x}$	0,11	1,29	1,82
	s	0,08	1,02	0,86
100	$\bar{x}$	0,08	2,22	2,35
	s	0,07	2,06	1,16
120	$\bar{x}$	0,06	3,00	2,96
	s	0,09	2,84	1,99

Tabelle 10: Acetoacetat-Konzentrationen in mg/100 ml (Mittelwert $\bar{x}$, Standardabweichung s) der jeweiligen Gruppe (A: Leerperfusion, B: Hämoglobinfreie Leberperfusion, C: Leberperfusion mit Erythrozyten).

3.1.8. Lactat/Pyruvat

Entnahme- zeiten (Minuten)		G r u p p e		
		A	B	C
1	$\bar{x}$	7,2	5,7	8,2
	s	0,94	1,84	2,30
20	$\bar{x}$	7,1	8,6	15,8
	s	0,53	2,90	6,15
40	$\bar{x}$	7,3	8,8	18,5
	s	0,76	2,12	8,47
60	$\bar{x}$	7,3	7,9	20,2
	s	0,82	0,99	10,02
80	$\bar{x}$	7,1	8,7	20,1
	s	0,94	1,27	10,46
100	$\bar{x}$	7,2	8,7	20,6
	s	0,52	3,11	11,75
120	$\bar{x}$	7,1	8,3	21,2
	s	1,46	5,54	12,73

Tabelle 11: Lactat/Pyruvat (Mittelwert $\bar{x}$, Standardabweichung s) der jeweiligen Gruppe (A: Leerperfusion, B: Hämoglobinfreie Leberperfusion, C: Leberperfusion mit Erythrozyten).

Die Werte der Quotienten blieben für die Leerperfusionsen unverändert. Für die Leberperfusionsen ohne Erythrozyten stellte sich ein gleichbleibender Quotient zwischen 8 und 9 ein. Bei den Leberperfusionsen mit Erythrozyten dagegen ein Wert um 20.

3.1.9. Beta-Hydroxybutyrat/Acetoacetat

Entnahme- zeiten (Minuten)		G r u p p e	
		B	C
1	$\bar{x}$	0,6	2,1
	s	0,42	3,15
20	$\bar{x}$	2,0	1,1
	s	1,98	0,85
40	$\bar{x}$	0,8	1,3
	s	0,21	0,88
60	$\bar{x}$	1,2	1,6
	s	0,64	1,01
80	$\bar{x}$	1,1	1,8
	s	0,57	1,06
100	$\bar{x}$	1,1	2,0
	s	0,57	1,17
120	$\bar{x}$	1,2	2,2
	s	0,64	1,38

Tabelle 12: Beta-Hydroxybutyrat/Acetoacetat (Mittelwert $\bar{x}$, Standardabweichung s) der jeweiligen Gruppe (B: Hämoglobin-freie Leberperfusion, C: Leberperfusion mit Erythrozyten).

Auch hier kam es zur Einstellung sich nur mehr geringfügig verändernder Werte der Quotienten, die bei den Perfusionen ohne Erythrozyten (B) niedriger lagen als bei den Versuchen mit Erythrozyten (C); signifikante Unterschiede fanden sich nicht.

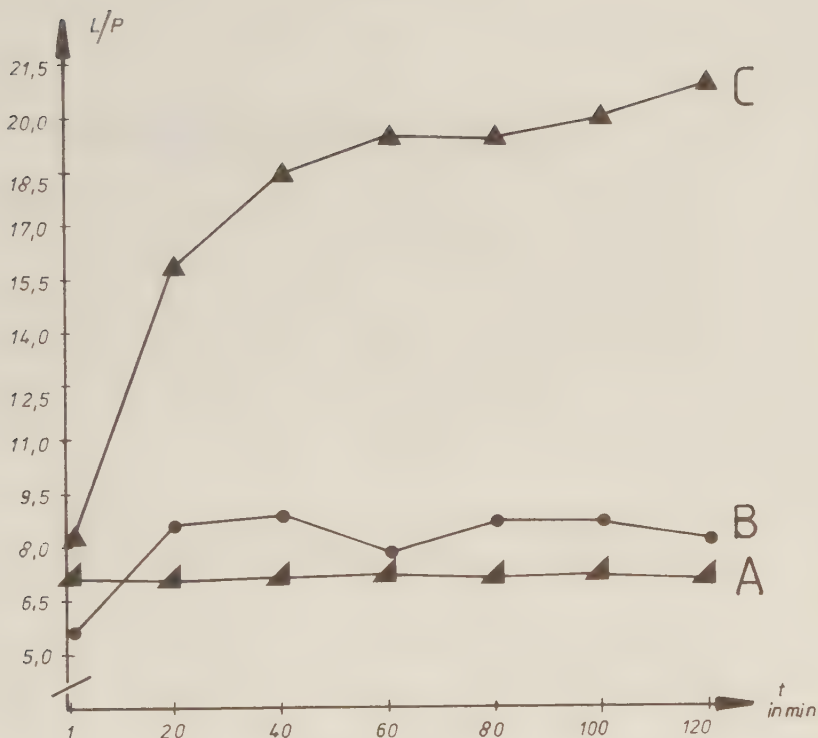


Abb. 15: Quotient aus Lactat zu Pyruvat (L/P); Mittelwerte der Gruppen A, B, C (Standardabweichung siehe Tabelle 11).

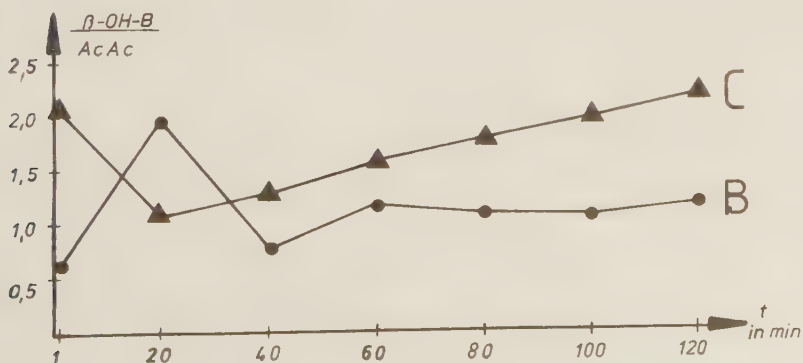


Abb. 16: Quotient aus Beta-Hydroxybutyrat (Beta-OH-B) zu Acetoacetat (AcAc); Mittelwerte der Gruppen B, C (Standardabweichungen siehe Tabelle 12).

3.1.10. Änderungen der Glucose-, Pyruvat- und Lactatmengen im Perfusionsmedium

Aus den Angaben von 3.1. wurden für die Gruppe C jeweils die Mengen an Glucose, Pyruvat und Lactat berechnet, die pro Gramm Leberfrischgewicht und dem Zeitintervall zwischen zwei Probenentnahmen an das Perfusionsmedium abgegeben wurden. Als Leberfrischgewicht wurde 1/25 des mittleren Gewichts der Ratten (siehe 3.3.1.), 18,0 g eingesetzt. Das durch die Probenentnahmen sich verringernde Volumen des Perfusionsmediums wurde berücksichtigt.

Zeitintervall (Minuten)	Änderungen in $\mu\text{mol/g}$ Leber- frischgewicht		
	Glucose	Lactat	Pyruvat
1 - 20	3,06	5,01	-0,54
20 - 40	3,27	4,53	0,07
40 - 60	1,58	4,23	0,09
60 - 80	1,73	2,88	0,14
80 - 100	2,01	2,41	0,11
100 - 120	1,53	1,92	0,06
Gesamt	13,18	20,98	-0,07

Tabelle 13: Mengenänderungen von Glucose, Lactat und Pyruvat in $\mu\text{mol/g}$ Leberfrischgewicht in den Zeitintervallen zwischen den Probeentnahmen. Grundlage der Berechnungen: Mittelwerte der 85 Leberperfusionen bei Gruppe C.

Nach einer anfänglich höheren Menge stellte sich bald ein relativ konstanter Wert für die Abgabe der Glucose in die Perfusionslösung ein. Er lag zwischen 1,5 und 2,0 μmol Glucose/g Leberfrischgewicht. Die Werte für Lactat dagegen zeigten einen kontinuierlichen Abfall im Perfusionszeitraum.

3.2. Hämatologische Parameter

Bei jeder Probenentnahme wurden bestimmt: Das gesamte Hämoglobin der Probe, die Zellzahl sowie das Hämoglobin im Überstand nach Zentrifugation (siehe 2.1.7.4).

Auf die gemessenen Größen können folgende Faktoren der Versuchsanordnung Einfluß nehmen: Hämolyse, Ablagerung an Oberflächen oder strömungstoten Stellen des Perfusionssystems und letztendlich Sequestration durch die Leber.

3.2.1. Hämolyse

Bei der Perfusion hämolysierter Erythrozyten (Serie III) fand sich für das freie, nicht in Erythrozyten gebundene Hämoglobin im Überstand ($Hb_{\bar{u}}$) folgender Verlauf:

$Hb_{\bar{u}}$ (mg/100 ml)	Entnahmezeiten (Minuten)						
	1	20	40	60	80	100	120
$\bar{x}$	41,57	42,00	41,39	40,87	41,92	42,00	41,57
s	0,12	0,25	0,62	1,11	2,10	0,50	0,87

Tabelle 14: Hämoglobinkonzentrationen im Überstand ($Hb_{\bar{u}}$) in mg/100 ml bei Perfusionen mit hämolysierten Rattenerythrozyten (Serie III).

Das durch Hämolyse freigewordene Hämoglobin blieb während der Dauer der Perfusion konstant. Es wurde weder meßbar von der Leber entfernt, noch lagerte es sich in der Perfusionsapparatur ab.

Bei Serie III wurde die Hämolyse vor dem Versuch mit destilliertem Wasser herbeigeführt. Doch auch während der Perfusion selbst wurden Erythrozyten vorwiegend durch mechanische Einflüsse (Rollpumpe, Magnetrührer, Schlauchverbindungen) zerstört. Die Menge des aus ihnen freigewordenen Hämoglobins gibt das Ausmaß der mechanischen Schädigung der Erythrozyten wieder.

Hb _ü (mg/100 ml)	Entnahmezeiten (Minuten)						
	1	20	40	60	80	100	120
$\bar{x}$	3,08	4,87	6,33	7,20	8,28	9,29	10,19
s	1,65	2,45	2,96	3,76	4,20	4,70	4,94

Tabelle 15: Hämoglobinkonzentrationen im Überstand (Hb_ü) in mg/100 ml bei 74 Perfusionen mit Rattenerythrozyten (Serie V - XV).

Während der Perfusionsdauer erhöhte sich die Konzentration an freiem Hämoglobin von 3,08 auf 10,19 mg/100 ml.

Die Konzentration des gesamten Hämoglobins der Probe betrug bei den 74 Experimenten im Mittel $41,12 \pm 7,15$ mg/100 ml. Davon lagen zu Beginn 38,04 mg/100 ml des Hämoglobins in intakten Erythrozyten vor. Auf diesen Wert bezogen belief sich die Hämolyse während der zweistündigen Versuchszeit auf 18,7% !

Der recht hohe Wert verdeutlicht die Notwendigkeit schonender Perfusionsbedingungen bei der Verwendung von Rattenerythrozyten.

Eine meßbare Auswirkung auf die biochemischen Kontrollparameter konnte ausgeschlossen werden (siehe 3.1.).

Bei Phagozytoseversuchen muß eine Hämolyse dieser Größenordnung gegebenenfalls mit einberechnet werden, um falsch niedrige Werte zu vermeiden. Ein Einfluß der Hämolyse auf die Werte der Zellzahlbestimmung ist ebenfalls zu erwägen. Denkbar wäre, daß die Hämolyse die Zellzahl unbeeinflusst läßt, da sich Erythrozytenghosts nach Entleerung des Hämoglobins wieder zu ähnlich großen Korpuskeln schließen können (124). Andererseits könnte durch anschließende Sequestration durch die Leber die Zellzahl im Perfusat abnehmen.

Weiterhin wurde das Gesamthämoglobin (Hb_{ges}), die Differenz von Gesamthämoglobin und freiem Hämoglobin (Hb_{ges} - Hb_ü) sowie die Zellzahl (ZZ) bei den 10 Perfusionen mit autologen Erythrozyten (Serie V) verglichen. Die Differenz aus dem

Gesamthämoglobin Hb_{ges} und dem Hämoglobin im Überstand ($Hb_{\bar{u}}$) diente dabei als Parameter für das Hämoglobin in noch intakten Erythrozyten. Zum besseren Vergleich wurde die Zellzahl mit dem Färbekoeffizienten (Hb_E) von Rattenerythrozyten mit ($Hb_{ges} - Hb_{\bar{u}}$) multipliziert.

Als Wert für Hb_E wurde 26,15 pq aus den Einminutenwerten von $Hb_{ges} - Hb_{\bar{u}}$ und der Zellzahl der 10 Perfusionen von Serie V berechnet. Daraus ergab sich ebenfalls eine Hämoglobinkonzentration (Hb_{ZZ}), ein Maß für die Zellzahl im Perfusat.

Entnahmezeiten (Minuten)		Hämoglobin in mg/100 ml		
		Hb_{ges}	$Hb_{ges} - Hb_{\bar{u}}$	Hb_{ZZ}
1	$\bar{x}$	40,02	38,02	38,02
	s	3,21	3,21	3,98
20	$\bar{x}$	37,21	33,69	35,99
	s	4,19	4,68	5,90
40	$\bar{x}$	35,74	31,69	33,21
	s	4,54	4,93	5,42
60	$\bar{x}$	35,02	30,45	32,02
	s	4,95	5,78	5,53
80	$\bar{x}$	34,99	29,93	31,02
	s	5,21	5,89	6,55
100	$\bar{x}$	34,79	29,12	30,50
	s	5,57	6,90	7,13
120	$\bar{x}$	34,30	28,19	29,46
	s	5,40	7,01	7,08

Tabelle 16: Hämoglobinkonzentrationen in mg/100 ml in der gesamten Probe (Hb_{ges}) sowie in intakten Erythrozyten ($Hb_{ges} - Hb_{\bar{u}}$) und Hb_{ZZ} (siehe Text) bei den 10 Perfusionen der Serie V.

$Hb_{ges} - Hb_{\bar{u}}$ fielen in gleicher Weise ab, was darauf hindeutet, daß hämolysierte Erythrozyten entweder nicht mehr mitgezählt

oder von der Leber aus dem Perfusat entfernt wurden. Die Auswertung (nicht dargestellt) von 8 Experimenten der Serien V und VI, bei denen eine besonders deutliche Hämolyse stattgefunden hatte, ergab ein ähnliches Resultat. Da nach Hämolyse in destilliertem Wasser (siehe 3.7.3.1) wie nach mechanischer Zerstörung (128) Erythrozytenghosts weiterhin gezählt werden können, muß eine Sequestration mechanisch in der Perfusionsapparatur geschädigter Erythrozyten angenommen werden. Da diese Versuche nicht spezielle zur Klärung dieser Fragestellung konzipiert worden waren, muß eine sichere Beantwortung noch offen bleiben. Aus diesem Grunde wurde die Zellzahlmessung in die folgende Auswertung der Experimente nicht mit aufgenommen.

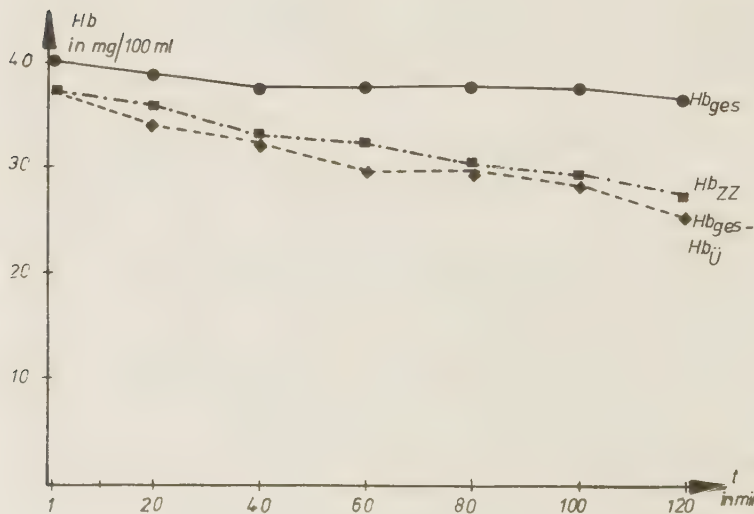


Abb. 17: Hämoglobinkonzentrationen in mg/100 ml von Hb_{ges}, Hb_{ges} - Hb_U und Hb_{ZZ} bei 10 Perfusionen der Serie V (Standardabweichungen siehe Tabelle 16).

3.2.2 Ablagerung

Bei Perfusionen ohne Leber können Einflüsse des Organs auf die Hämoglobinmenge ausgeschlossen werden. Eine Abnahme des Hämoglobins der Probe stellt also einen Parameter für die Höhe der Ablagerungen von roten Blutzellen im System dar.

Hb _{ges} (mg/100 ml)	Entnahmezeiten (Minuten)						
	1	20	40	60	80	100	120
$\bar{x}$	38,15	35,12	39,10	38,08	38,19	37,49	37,31
s	3,54	3,19	7,54	3,20	3,03	3,21	3,23

Tabelle 18: Konzentration des gesamten Hämoglobins der Probe (Hb_{ges}) in mg/100 ml bei 5 Perfusionen ohne Leber (Serie II).

Die Konzentrationen von Hb_{ges} änderten sich während der Perfusion nicht signifikant. Die geringen, an Glasgefäßen makroskopisch sichtbaren, Ablagerungen erreichten also keine meßbare Größe und wurden im folgenden deshalb vernachlässigt.

3.2.3. Zusammenfassende Bewertung der hämatologischen Parameter

Aufgrund des bisher unter 3.2. gesagten, ergibt sich folgendes Schema:

Hämatologischer Parameter	Ablagerung	Hämolyse	Sequestration
Hb _{ges}	*	-	+
Hb _{ij}	*	+	-
Hb _{ges} - Hb _{ij}	*	+	+
ZZ	*	+	+

*: Kein meßbarer Einfluß

Tabelle 19: Legende siehe Seite 66.

Tabelle 19: Zusammenfassende Bewertung der hämatologischen Parameter bei der Leberperfusion mit Erythrozyten.

Hb_{ges} - $Hb_{ü}$ sowie ZZ werden von Hämolyse und Sequestration durch die Leber beeinflusst, $Hb_{ü}$ ausschließlich von der Hämolyse. Nur das Gesamthämoglobin der Probe (Hb_{ges}) hängt allein von der Sequestration in der Leber ab und wurde deshalb im folgenden als ihr Parameter verwendet.

3.2.4. Graphische Darstellung der hämatologischen Parameter

Anhand einer graphischen Darstellung können die hämatologischen Parameter verdeutlicht werden.

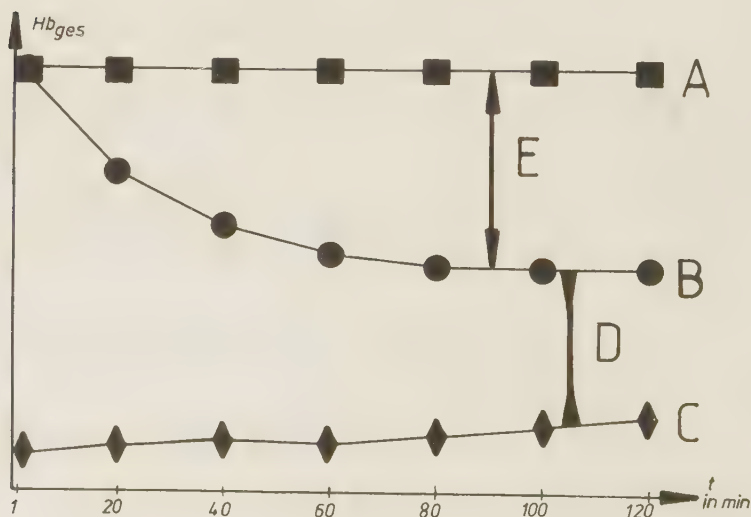


Abb.18 : Schema zur graphischen Darstellung der hämatologischen Parameter bei der Perfusion mit Erythrozyten. (Legende siehe S. 67)

- A: Ausgangskonzentration von Hb_{ges} (in mg/100 ml)
()
- B: Hb_{ges} (in mg/100 ml) ()
- C: $Hb_{ü}$ (in mg/100 ml) ()
- D: $Hb_{ges} - Hb_{ü}$, die Konzentration des Hämoglobins in noch intakten Erythrozyten. ()
- E: Die Abnahme des Probenhämoglobins (Hb_{ges}) als Maß für die stattgefundene Phagozytose. ()

3.3. Weitere Versuchsparameter

3.3.1. Lebertrockengewicht

Das Lebertrockengewicht betrug bei 81 Messungen im Mittel $4,78 \pm 0,89$ g.

Der prozentuale Anteil des Lebertrockengewichts am gesamten Rattengewicht belief sich bei 64 Messungen auf $1,07 \pm 0,12\%$ (siehe 2.1.7.3). Um eine bessere Vergleichbarkeit mit Angaben anderer Laboratorien herzustellen wurde die Flußrate des Perfusionsmediums auf das Lebertrockengewicht bezogen.

3.3.2. Flußrate des Perfusionsmediums

Die Flowrate beeinflußt die Sauerstoffversorgung der perfundierten Rattenleber maßgeblich (siehe 4.1.). Auch aus diesem Grunde sollte sie dem Gewicht der Leber angepaßt werden. Bei 81 durchgeführten Leberperfusionen mit Erythrozyten betrug sie im Mittel $5,96 \pm 1,01$ ml/q Lebertrockengewicht und Minute.

3.4. Ergebnisse des Verfahren zur Dichtentrennung von Erythrozyten der Ratte

3.4.1. Hämatologische Parameter der Fraktionen

		F r a k t i o n					
		I		II		III	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
Fraktion	A	9,55	0,74	80,69	1,42	9,76	1,44
in %	B	11,88	2,69	75,27	4,57	12,86	2,00
MCV	A	58,3	5,8	53,8	1,7	51,3	1,5
in μm^3	B	51,3	0,8	49,3	0,8	46,8	1,2
MCHC	A	37,65	1,53	40,03	2,82	48,81	11,19
in *	B	38,44	2,58	41,47	4,13	42,41	3,55
MCH	A	21,90	1,44	21,57	1,98	25,17	6,45
in pg	B	19,75	1,55	20,47	2,17	19,86	1,61

*: g Hb/100 ml Erythrozyten

Tabelle 20: Gegenüberstellung der hämatologischen Parameter (siehe 2.4.) der Trennungen von Rattenerythrozyten nach den Methoden von PLATT et al. (A) und MURPHY (B) (siehe 2.2.) Aufgeführt sind jeweils die oberste (I), die mittlere (II) und die unterste (III) Fraktion. Pro Verfahren wurden 6 Trennungen durchgeführt.

Die angestrebten Fraktionsgrößen von etwa 10%, 80% und 10% wurden bei beiden Trockenverfahren erreicht. Signifikante Unterschiede ließen sich nur für das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV) errechnen. Sie bestanden für beide Verfahren zwischen den Fraktionen I und III, sowie I und II, für die Methode nach MURPHY auch zwischen II und III. Während für das mittlere korpuskuläre Hämoglobin (MCV) eine Konstanz der Meßwerte zu verzeichnen war, ließ sich für die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) bei beiden Verfahren ein Ansteigen der Werte beobachten. Das Verhältnis zwischen den Werten für MCHC der unteren zur oberen Fraktion wird bei MURPHY (92) (für Fraktionsgrößen von 5%) mit 1,24 angegeben. Bei Fraktionsgrößen von 10% ließ sich hier ein Verhältnis von 1,10 errechnen.

Beim Verfahren nach PLATT et al. ergab sich ein Quotient von 1,30. Eine statistische Absicherung des Unterschieds war wegen der geringen Zahl der Bestimmungen nicht zu erreichen. Das Verhalten der aufgeführten Erythrozytenindices stimmte mit den Angaben in der Literatur überein (116, 92, 23, 127). Für die Fraktion III, jene der alten Erythrozyten, wurden kleinere mittlere Zellvolumina, jedoch unveränderte mittlere Mengen an Hämoglobin pro Zelle (MCH) festgestellt. Während der reife Erythrozyt im Laufe seines Lebens also kein Hämoglobin verliert und auch nicht neu synthetisieren kann, steigt durch die Abnahme des Zellvolumens die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) an.

3.4.2. N-Acetylneuraminsäure-(NANA)gehalt der Fraktionen

		I		II		III	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
Fraktion	A	9,20	0,3	81,50	1,7	9,30	1,4
in %	B	9,61		77,51		12,89	
NANA	A	5,39	0,88	6,42	0,93	4,00	0,86
in fq/RBC	B	5,69	0,34	5,89	0,35	4,85	0,31

Tabelle 21: Gegenüberstellung des Gehalts an N-Acetylneuraminsäure (NANA) in fq/Erythrozyt (RBC) aus den Fraktionen, getrennt nach den Verfahren von PLATT et al. (A) und MURPHY (B).

Innerhalb der Trennverfahren ergaben sich für beide Methoden signifikante Unterschiede des NANA-Gehalts der Erythrozyten zwischen den Fraktionen I und III sowie II und III. Die Irrtumswahrscheinlichkeit lag dabei unter 1%, für den Vergleich zwischen AI und AIII unter 5%. Dies besagt, daß der NANA-Gehalt alter Erythrozyten verglichen mit jungen und reifen Erythrozyten abnimmt.

Auffallend war jedoch, daß bei beiden Trennungen die jungen (unreifen) Erythrozyten jeweils weniger NANA enthielten als die reifen Zellen. Ein signifikanter Unterschied ließ sich jedoch nicht errechnen.

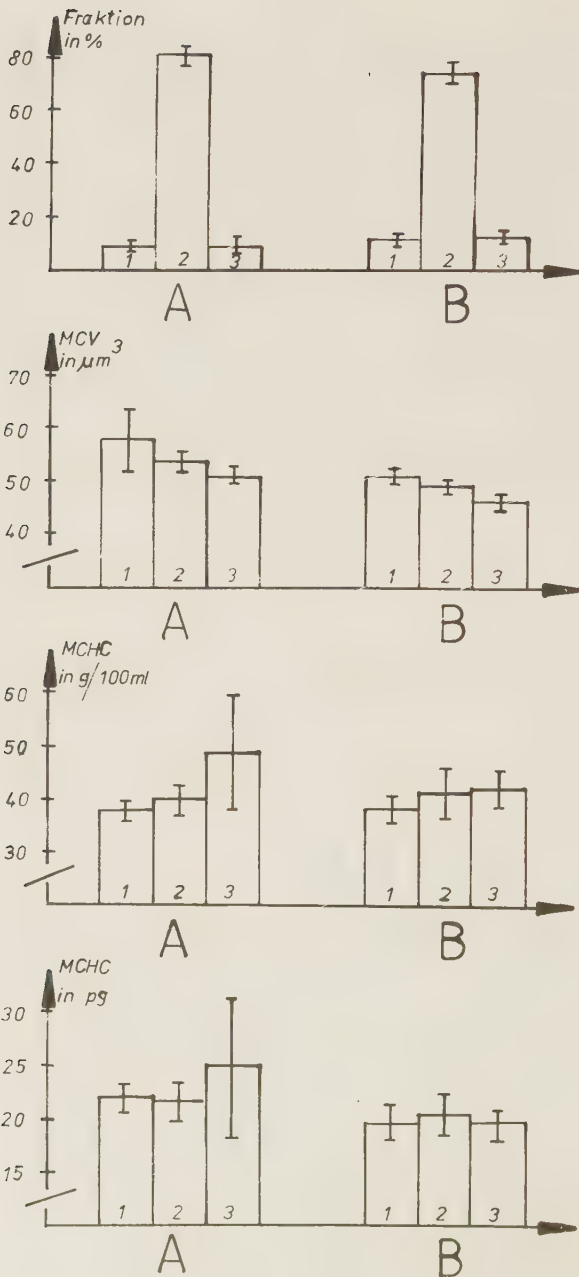


Abb. 19: Gegenüberstellung der Trennungsmethoden nach PLATT et al. (A) und MURPHY (B) anhand der Fraktionsgröße und der hämatologischen Parameter.

I bezeichnet die obere, II die mittlere und III die untere Fraktion (siehe Tabelle 20)

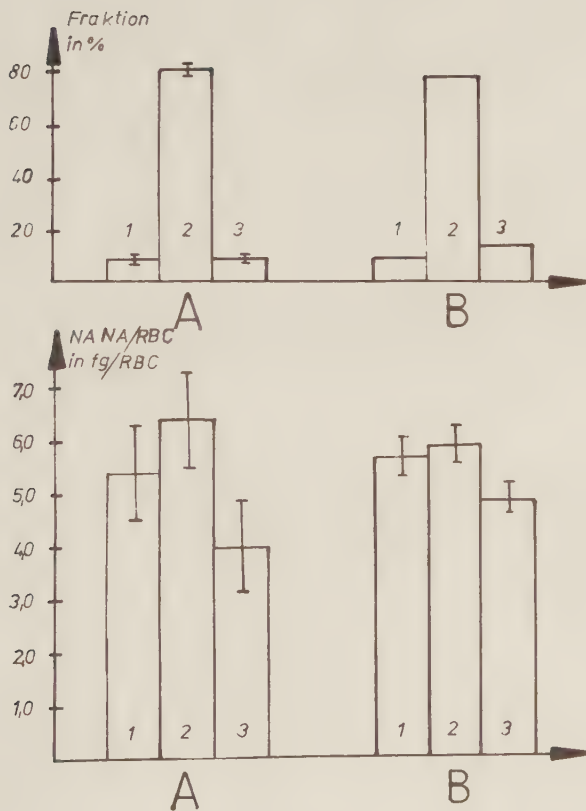


Abb.20: Gegenüberstellung des Gehalts an N-Acetylneuraminsäure (NANA) pro Erythrozyt (RBC) in fg/RBC aus den einzelnen Fraktionen nach PLATT et al. (A) und MURPHY (B) (siehe Tabelle 21.)

3.5. Ergebnisse der Trennung mit dem Elutriationsrotor

		I		II		III	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
Fraktion	B	11,88	2,69	75,27	4,57	12,86	2,00
in %	C	15,34	1,84	75,22	2,08	9,44	1,84
MCV	B	51,3	0,8	49,3	0,8	46,8	1,2
in μm^3	C	47,0	3,6	50,0	3,6	55,8	3,5

Labelle 22: Gegenüberstellung der Trennungen mit dem Elutriationsrotor (C) und nach MURPHY (B) anhand des MCV der drei Fraktionen. Es wurden jeweils 6 Trennungen durchgeführt.

Die Aufteilung nach dem Elutriationsprinzip (siehe 2.3.) ergab ansteigende Werte für das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV). Der Unterschied zwischen den Fraktionen II und III ließ sich statistisch mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% bestätigen, für die Fraktionen I und III lag sie unter 1%.

Kleine Erythrozyten, bei den Dichtezentrifugationen die alten Zellen, verließen somit als erste Fraktion die Trennkammer des Rotors. Große Erythrozyten, bei den Dichtezentrifugationen die jungen Zellen, wurden als letzte ausgeschwemmt.

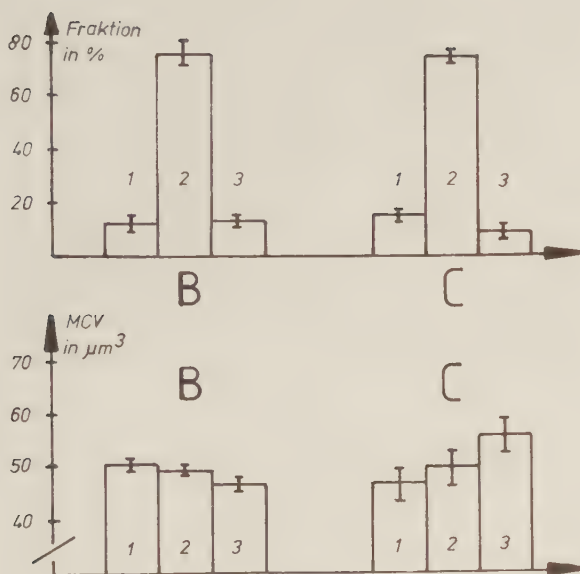


Abb.21: Mittleres zelluläre Volumen (MCV) von Rattenerythrozyten jeweils dreier Fraktionen (mit jeweiliger Fraktionsgröße), gewonnen in den Trennverfahren nach MURPHY (B) und mit dem Elutriationsrotor (C).

3.6. N-Acetylneuraminsäuregehalt von Rattenerythrozyten

3.6.1. Abspaltbare NANA

Aus den Erythrozyten von 4 Ratten wurden insgesamt 24 Bestimmungen der NANA durchgeführt (siehe 2.5.), die mittels Säurehydrolyse (siehe 2.5.2.2) von den Membranen abgespalten werden konnte.

Mit den Erythrozyten von 5 Ratten wurden insgesamt 5 Inkubationen mit Neuraminidase (siehe 2.6.) durchgeführt und die enzymatisch abgespaltene Menge an NANA im Überstand gemessen.

NANA in fg/RBC	x	s
Säurehydrolyse (n = 24)	5,52	1,26
Enzymatische Abspaltung (n = 5)	4,99	0,56

Tabelle 23: Säurehydrolytisch und enzymatisch aus Rattenerythrozyten abspaltbare Menge an N-Acetylneuraminsäure (NANA) in fg/Erythrozyt (RBC). Dabei entspricht n der Anzahl der durchgeführten Bestimmungen.

Mit dem Enzym Neuraminidase konnte 90,4% der durch Säure abspaltbaren NANA von der Erythrozytenmembran entfernt werden. Nach enzymatischer Behandlung verblieben rechnerisch im Mittel noch 0,53 fg NANA auf den Zellen. Die so behandelten Erythrozyten wurden in den Serien VIII und IX perfundiert.

3.6.2. N-Acetylneuraminsäuregehalt verschiedener Präparationen perfundierter Erythrozyten

Der NANA-Gehalt der Erythrozyten wurde für die aufgeführten Serien entweder rechnerisch (durch Subtraktion der im Überstand vorhandenen von der gesamten Erythrozyten-NANA vor NANA-ase Behandlung) oder anhand einer vergleichbaren Präparation ermittelt.

Perfusionsserie Nr.	n	NANA-Gehalt der Erythrozyten in fg/RBC	
		$\bar{x}$	s
V und VI	24	5,52	1,26
X	6	5,69	0,34
XI	6	5,88	0,35
XII	6	4,85	0,31
VIII und IX	5	0,53	0,56

Tabelle 24: Zusammenstellung des Gehalts an Membran-NANA der Rattenerythrozyten in fg/RBC bei verschiedenen Perfusionsserien.

Zwischen den Serien V, VI, X und XI läßt sich ein signifikanter Unterschied nicht errechnen. Die Serie XII weist einen signifikant kleineren NANA-Gehalt pro Erythrozyt auf als die Serien X und XI.

Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 1% läßt sich auch ein Unterschied aller bisher genannten Perfusionsserien zu VIII und IX nachweisen.

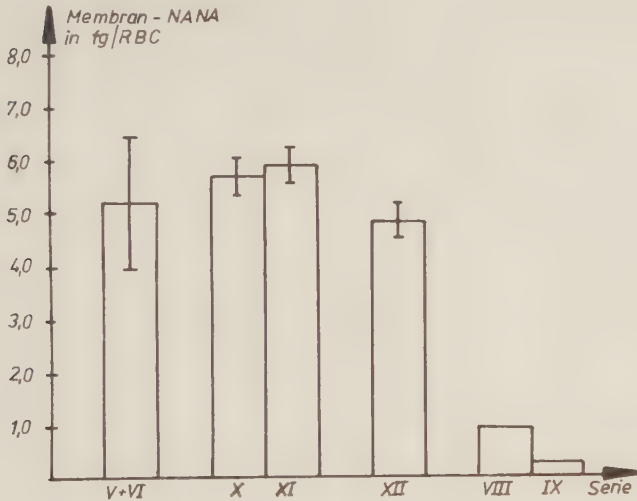


Abbildung 22: Zusammenstellung des Gehalts an NANA der Rattenerythrozyten in fg/RBC bei verschiedenen Perfusionsserien.

3.7. Perfusionsversuche mit Erythrozyten (siehe Tab.2)

3.7.1. Perfusionen zur Absicherung der Methoden

Die Serien I, II, III und XVI wurden bereits unter 3.1. und 3.2. dargestellt. Die Ergebnisse der Perfusionsserien V und VI werden unter 3.7.2., Serie III zusätzlich unter 3.7.3.1 besprochen.

3.7.2. Perfusionen mit verschiedenen Arten von Erythrozyten

3.7.2.1 Menschliche Erythrozyten

Menschliche Erythrozyten wurden wie beschrieben gewonnen (2.8.2.1) und bei 7 Leberperfusionen eingesetzt (Serie XVII)

Entnahme- zeiten (Minuten)	Serie XVI		Serie XVII	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1	100,0	0,0	100,0	0,0
20	96,6	3,8	73,8	15,0
40	98,3	5,7	59,7	21,8
60	95,7	6,2	51,4	24,6
80	94,9	5,9	45,5	27,2
100	97,3	3,8	40,7	26,7
120	95,6	4,4	39,0	26,6

Tabelle 25: Gesamthämoglobinwerte (Hb_{ges}) in % des Einminutenwertes bei Leerperfusionen (Serie XVI) und Leberperfusionen mit menschlichen Erythrozyten der Blutgruppe 0, rhesus negativ (Serie XVII).

Verglichen mit Leerperfusionen fand eine signifikante Abnahme bei der Leberperfusion mit menschlichen Erythrozyten (Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1%) statt. Ohne eingreifende präparative Veränderungen daran vorzunehmen, wurden menschliche Erythrozyten aus dem Perfusat entfernt. Der Erkennungsvorgang erfolgte dabei ohne Beteiligung von Serumopsoninen, die durch Waschen der Erythrozyten und Praeperfusion der Leber entfernt wurden.

Verglichen mit den Perfusionen von Rattenerythrozyten, wurde eine sehr hohe Standardabweichung beobachtet, die auf den auffallend unterschiedlichen Sequestrationsraten der verschiedenen Rattenlebern beruhte.

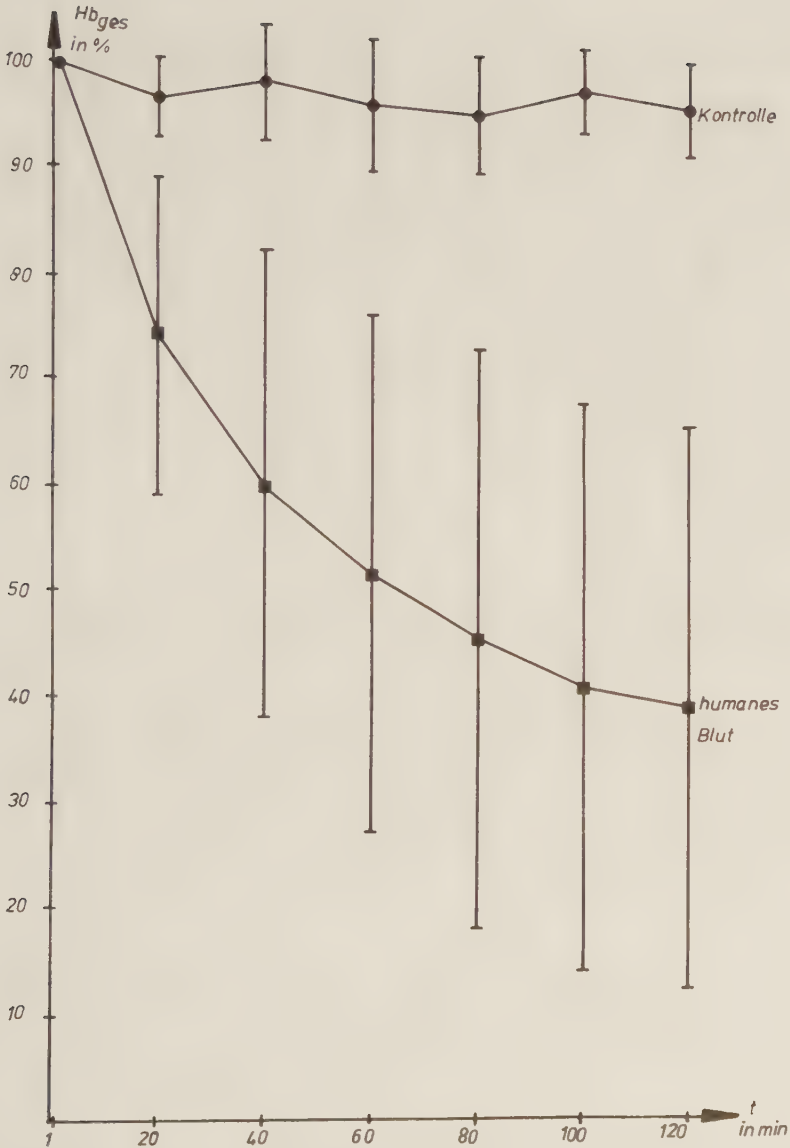


Abb.23: Gesamthämoglobin (Hb_{ges}) in % des Ausgangswertes bei Leerperfusionen (Serie XVI) und Leberperfusionen (Serie XVII) mit menschlichen Erythrozyten.

3.7.2.2 Autologe Rattenerythrozyten

In 10 Leberperfusionen wurden Erythrozyten des Tieres perfundiert, das auch als Leberspender diente.

Entnahme- zeiten (Minuten)	Serie II		Serie V	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1	100,0	0,0	100,0	0,0
20	100,1	5,0	92,4	5,4
40	102,7	5,0	88,8	7,9
60	99,9	3,6	87,0	9,4
80	100,3	3,7	86,9	9,6
100	98,4	4,2	86,3	10,9
120	98,0	4,3	85,1	10,0

Tabelle 26: Gesamthämoglobinwerte (Hb_{ges}) in % des Einminutenwertes bei Leerperfusionen (Serie II) und Leberperfusionen mit autologen (Serie V) Rattenerythrozyten.

Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 5% kann zur Serie ohne Leber ein Unterschied errechnet werden. Die Rattenleber entfernte in den ersten 40 Minuten der Perfusion 11,2% der eingesetzten Erythrozyten.

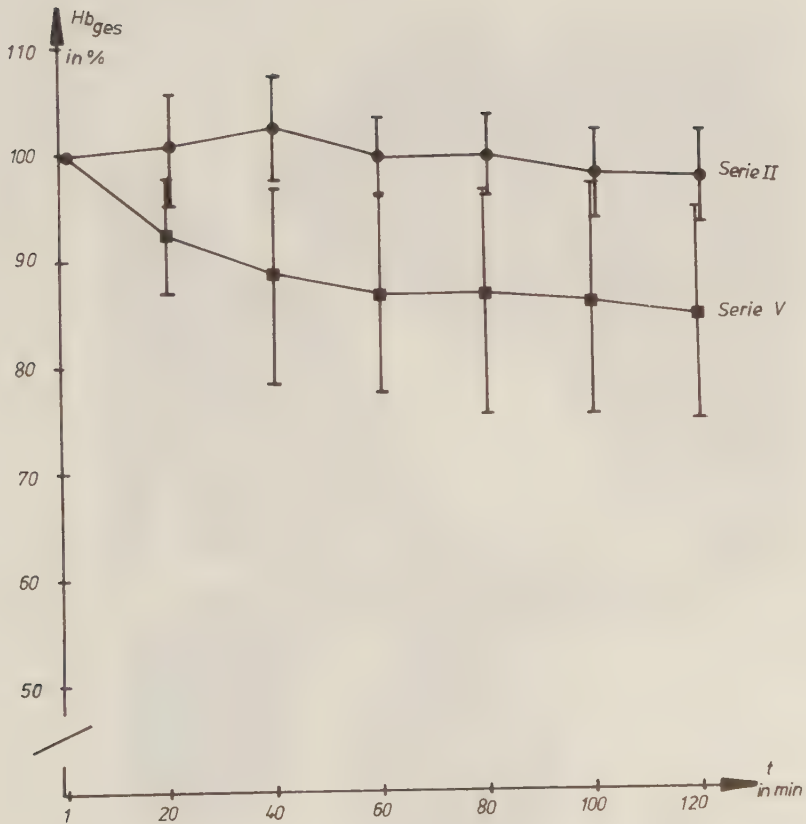


Abb. 24: Gesamthämoglobin (Hb_{ges}) in % des Ausgangswertes bei der Perfusion autologer Rattenerythrozyten (Serie V) und Leerperfusionen mit Rattenerythrozyten (Serie II).

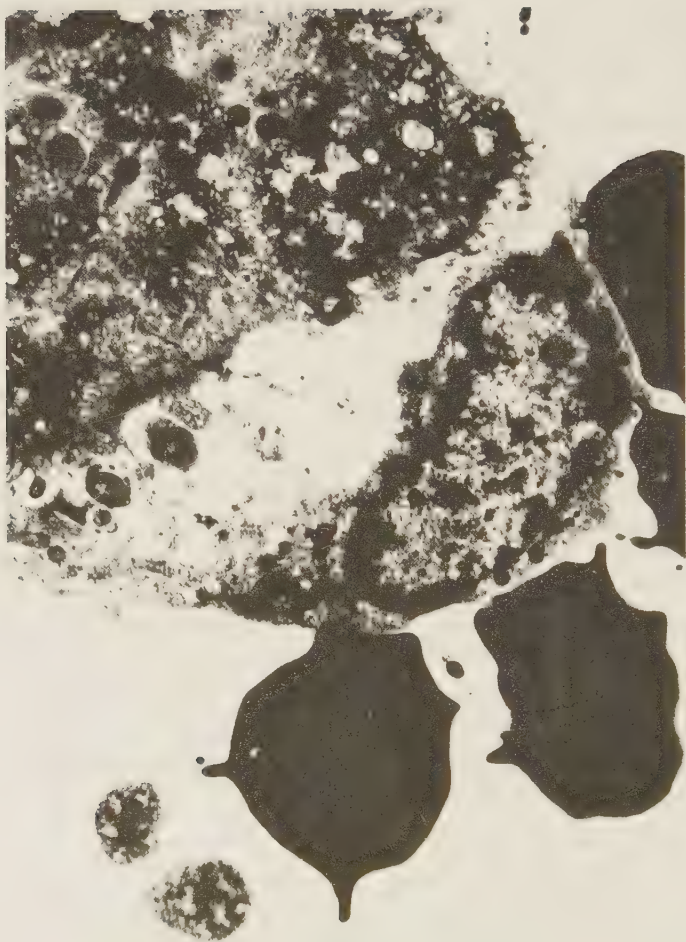


Abb. 25: von Kupffer'sche Sternzelle aus einer Leber nach
Perfusion mit autologen Rattenerythrozyten,
Serie V. Die von Kupffer'sche Sternzelle zeigt
nur sehr geringe Membranausstülpungen um vier
anhaftende rote Blutzellen.

3.7.2.3 Homologe Rattenerythrozyten

In 10 Leberperfusionen wurden Erythrozyten von Ratten perfundiert, die bei den Versuchen nicht die Leberspender waren.

Entnahme- zeiten (Minuten)	Serie VI		Serie V	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1	100,0	0,0	100,0	0,0
20	98,5	4,0	92,4	5,4
40	96,8	6,2	88,8	7,9
60	96,1	6,1	87,0	9,4
80	96,0	6,1	86,9	9,6
100	95,5	6,0	86,3	10,9
120	94,3	6,3	85,1	10,0

Tabelle 27: Gesamthämoglobinwerte (Hb_{ges}) in % des Einminutenwertes.

Serie VI: Homologe Rattenerythrozyten; Serie V: Autologe Rattenerythrozyten.

Während ein Vergleich mit den Leerperfusionen der Serie II keinen signifikanten Unterschied ergab, errechnete sich zwischen den Serien VI und V eine signifikante Verschiedenheit. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt dabei unter 5% und betrifft alle Werte.

Die Sequestration autologer roter Blutzellen überstieg also die der homologen Zellen.

Die Leberperfusionen mit Rattenerythrozyten wiesen ihrerseits, verglichen zu den Perfusionen mit menschlichen Erythrozyten, einen statistisch belegbaren Unterschied auf. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt dabei unter 1%.

Auch die homologen Rattenerythrozyten zeigten zu Beginn der Perfusion einen, allerdings geringeren, Abfall der Hämoglobinkonzentration im Perfusionsmedium. Statistisch gesehen verhielten sie sich jedoch wie bei Perfusionen ohne Rattenleber.

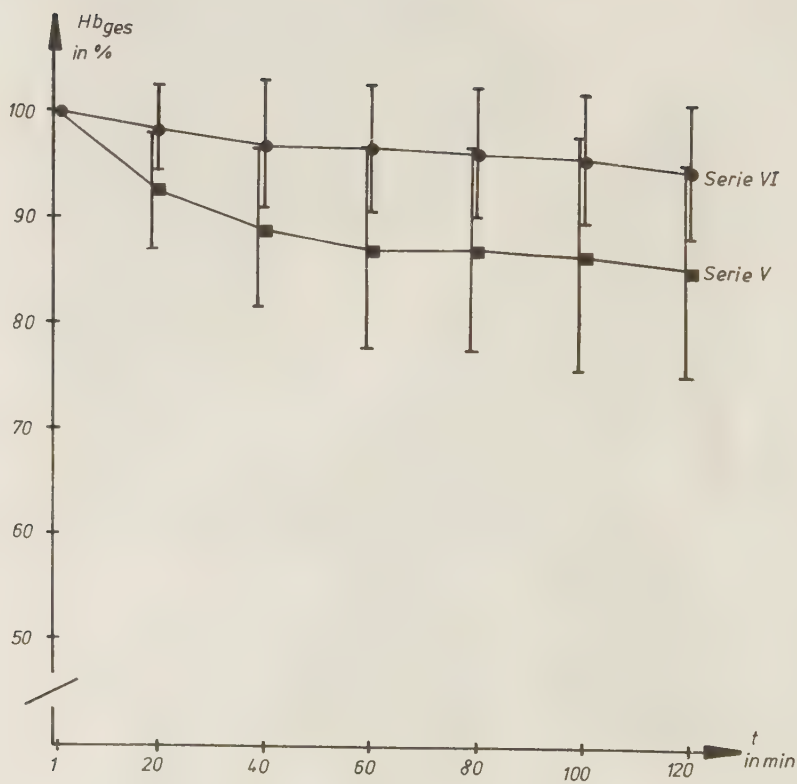


Abb. 26: Gesamthämoglobin (Hb_{ges}) in % des Ausgangswertes bei Perfusionen homologer (Serie VI) und autologer (Serie V) Rattenerthrozyten.

3.7.3. Versuche mit alterierten Erythrozyten

Für die folgenden Experimente wurden nur noch homologe Rattenerythrozyten eingesetzt und auch jeweils als Kontroll- oder Referenzversuchsgruppe statt der Leerperfusionen aufgeführt.

3.7.3.1 Hämolysierte Erythrozyten

Rattenerythrozyten wurden, wie beschrieben, hämolysiert (siehe 2.8.1.3) und bei 2 Leberperfusionen eingesetzt (Serie III). Hier konnte die Hämoglobinemessung in der gesamten Probe nicht mehr als Kriterium der Phagozytose dienen, da fast vollständige Hämolysen eintrat. Es wurden statt dessen die Zellzahlbestimmungen verwendet. Vor dem Versuch war die Zählbarkeit hämolysierter Erythrozyten im Coulter Counter nachgeprüft worden.

Entnahmezeiten (Minuten)	Serie III		Serie VI	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1	15,75	2,14	15,77	3,33
20	10,74	4,92	16,00	3,34
40	8,47	3,97	14,97	3,18
60	7,10	2,66	14,87	2,88
80	5,61	2,50	14,27	2,81
100	4,77	1,94	13,67	2,86
120	3,31	1,20	13,32	2,81

Tabelle 28: Zellzahlbestimmungen in 10^6 Erythrozyten pro ml der Serie III (hämolysierte homologe Rattenerythrozyten) sowie der Serie VI (homologe Rattenerythrozyten).

Ab dem 60-Minutenwert ergibt sich für die Serie III ein signifikanter Unterschied zur Serie VI mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 1%.

Nach Hämolysen wurden die Erythrozytenghosts von den von Kupffer'schen Sternzellen der Leber signifikant besser

erkannt und aus dem Perfusat entfernt. Auch dafür waren keine Serumfaktoren notwendig.

3.7.3.2 Glutaraldehydfixierte Rattenerythrozyten

Rattenerythrozyten wurden, wie beschrieben, fixiert (siehe 2.8.3.2) und in zwei Versuchen perfundiert (Serie IV). Auch hier konnte die Hämoglobinmessung als Kriterium der Phagozytose nicht benutzt werden, da die fixierten Blutzellen sich bei der Hämoglobinbestimmung nicht hämolysieren ließen. Vor dem Versuch war die Zählbarkeit fixierter Erythrozyten im Coulter Counter überprüft worden.

Entnahmezeiten (Minuten)	Serie IV		Serie VI	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1	12,12	3,39	15,77	3,33
20	2,80	1,47	16,00	3,34
40	0,89	0,77	14,97	3,18
60	0,26	0,08	14,87	2,88
80	0,11	0,04	14,27	2,81
100	0,09	0,04	13,67	2,86
120	0,08	0,03	13,32	2,81

Tabelle 29: Zellzahlbestimmungen in $10^6/\text{ml}$ der Serie IV (glutaraldehydfixierte Erythrozyten) sowie der Serie VI (homologe Rattenerythrozyten).

Ab dem 20-Minutenwert ergab sich zwischen beiden Serien ein signifikanter Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 1%. Dies gilt sowohl für die aufgeführten absoluten Konzentrationen, wie auch für die relativen Werte in % des Ausgangswertes (hier nicht aufgelistet).

Glutaraldehydfixierte Erythrozyten wurden von den von Kupffer'schen Sternzellen ohne Serumfaktoren erkannt und phagozytiert. Die Phagozytose konnte in morphologischen Untersuchungen gezeigt werden (siehe Abbildungen 28 und 29).

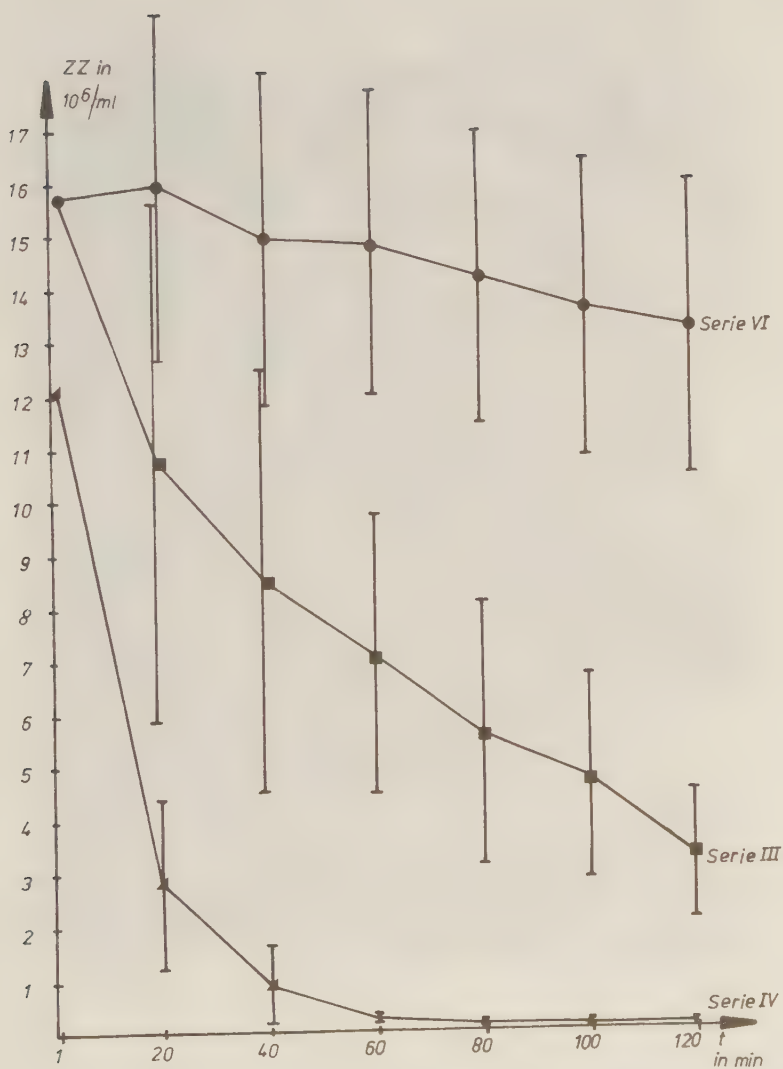


Abb. 27: Zellzahlmessungen in $10^6/\text{ml}$ bei hämolysierten (Serie III), glutaraldehydfixierten (Serie IV) und homologen (Serie VI) Rattenerthrozyten.

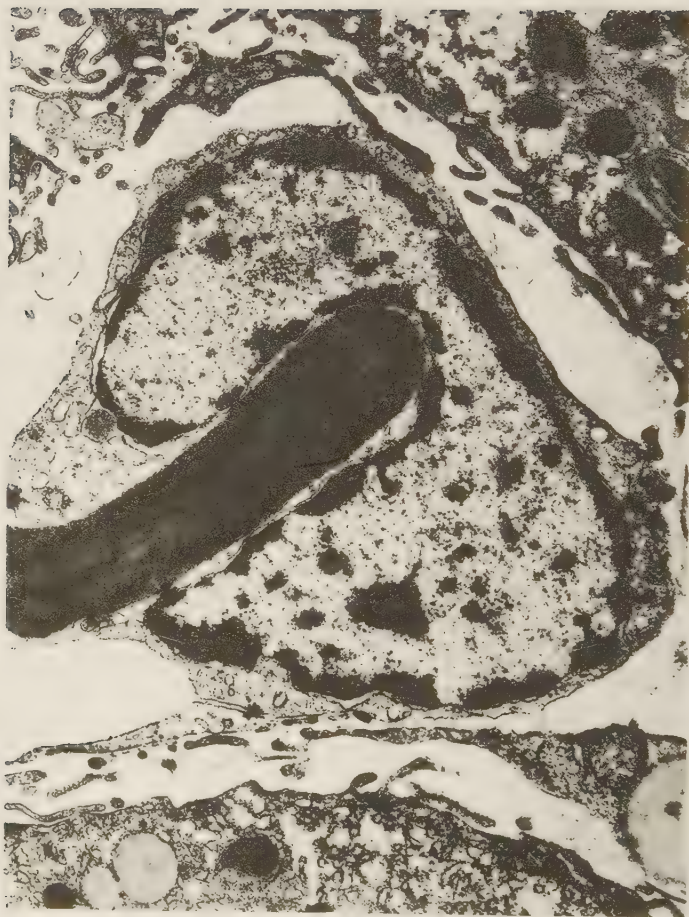


Abb. 28: von Kupffer'sche Sternzelle aus einer Leber nach Perfusion mit glutaraldehydfixierten homologen Rattenerythrozyten (Serie IV). Die rote Blutzelle liegt intrazellulär, der Kern der phagozytierenden Zelle ist eingestülpt.

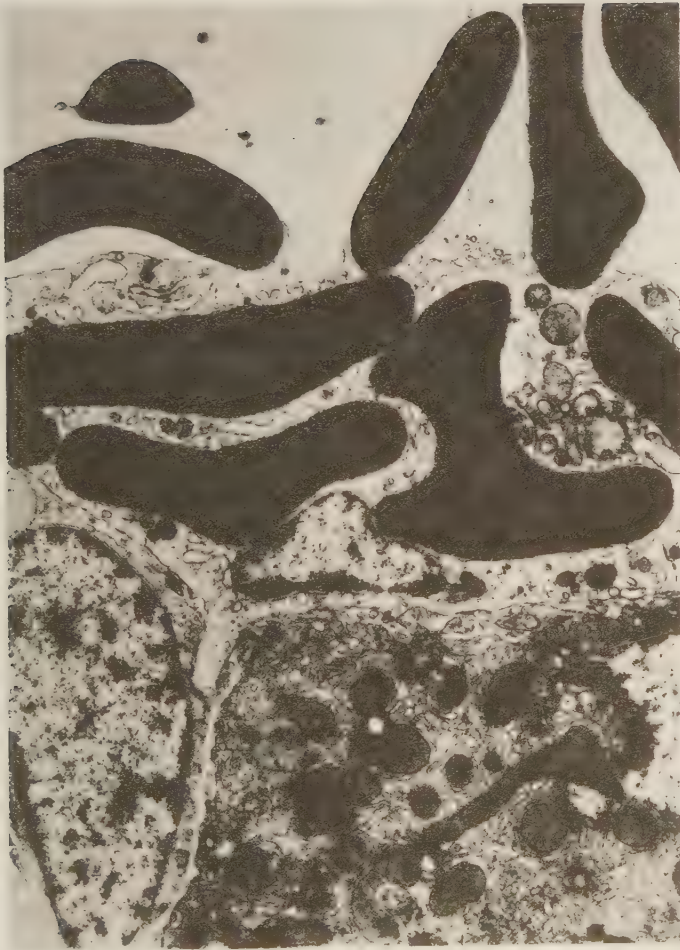


Abb.29: Zwei von Kupffer'sche Sternzellen aus dieser Leber nach Perfusion glutaraldehydfixierten homologen Rattenerthrozyten (Serie IV). Vier Erythrozyten liegen intrazellulär. Drei rote Blutzellen haften an der Zellmembran der von Kupffer'schen Sternzelle. Dabei sind die Membranausstülpungen zu beachten, die den laufenden Phagozytosevorgang anzeigen.

3.7.3.3 Erythrozyten nach enzymatischer Abspaltung von NANA

Von Rattenerythrozyten wurde, wie beschrieben (siehe 2.6.), NANA mittels des Enzyms Neuraminidase abgespalten. Nach einer weiteren Inkubation in Plasma (Serie IX) oder physiologischer Kochsalzlösung (Serie VIII) wurden diese Erythrozyten perfundiert.

Als Kontrollgruppe (Serie VII) dienten homologe Rattenerythrozyten, die wie unter 2.6.4. beschrieben, behandelt wurden. Jede Versuchsserie umfaßte 6 Experimente.

Entnahmezeiten (Minuten)	Serie VII		Serie VIII		Serie IX	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
20	94,0	2,4	77,1	11,3	82,2	12,4
40	94,2	2,1	75,4	8,1	77,8	11,9
60	94,8	2,8	76,1	13,8	75,6	14,5
80	96,7	1,9	76,1	16,7	76,7	17,9
100	98,4	2,0	79,2	18,4	76,1	16,5
120	98,9	1,2	79,6	18,5	75,8	17,3

Tabelle 30: Gesamthämoglobin (Hb_{ges}) in % des Ausgangswertes des jeweiligen Versuchs; Serie VII: Kontrollgruppe; Serie VIII: Ohne Plasmainkubation; Serie IX: Mit Plasmainkubation.

Vom ersten Wert bei einer Minute abgesehen, konnte für alle weiteren Probemittelwerte ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Serien VIII und IX errechnet werden. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt jeweils unter 5%. Zwischen den Serien VIII und IX konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Neuraminidasebehandelte Erythrozyten wurden mit und ohne vorherige Plasmainkubation von der Leber in erhöhtem Maße aus dem Perfusat entfernt. Dieser Anteil betrug zwischen 20 und 25% der Ausgangskonzentration an Hämoglobin.

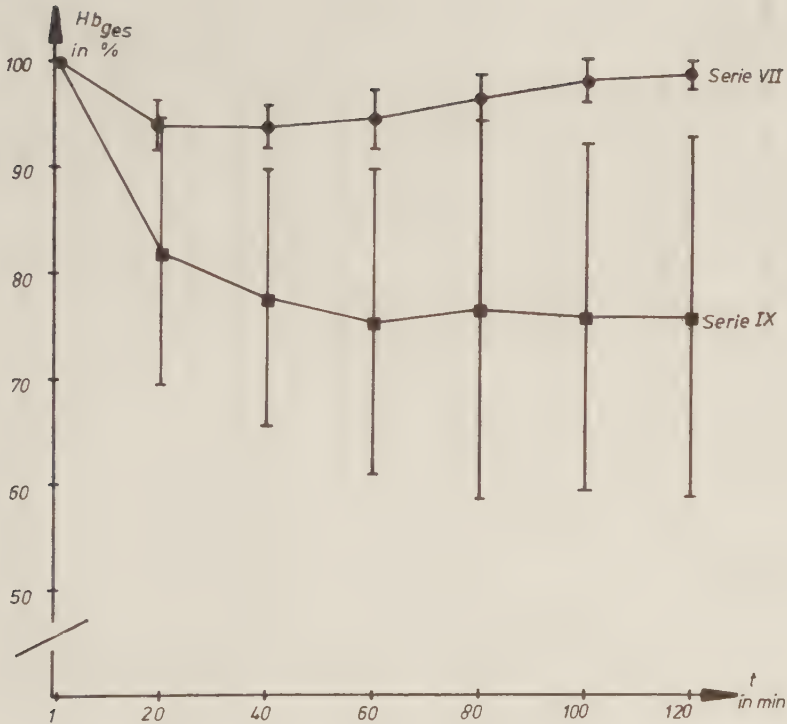


Abb. 30: Gesamthämoglobin (Hb_{ges}) in % des Einminutenwertes der Kontrollgruppe (Serie VII) sowie der Gruppe neuraminidase- und plasmainkubierter homologer Rattenerthrozyten (Serie IX)

Der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe Serie VII und den Perfusionsversuchen mit homologen Rattenerthrozyten (siehe 3.7.2.3) ergab eine Übereinstimmung. Lediglich für den 20-Minutenwert ließ sich ein Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% berechnen. Trotz der zweimaligen Inkubation der Kontrollgruppe wurden deren Erythrozyten also nicht soweit verändert, daß die Phagozyten der Leber dies hätten erkennen können. Dasselbe gilt auch für die Anwesenheit von Plasmafaktoren, mit denen die Kontrollgruppe auch inkubiert war.

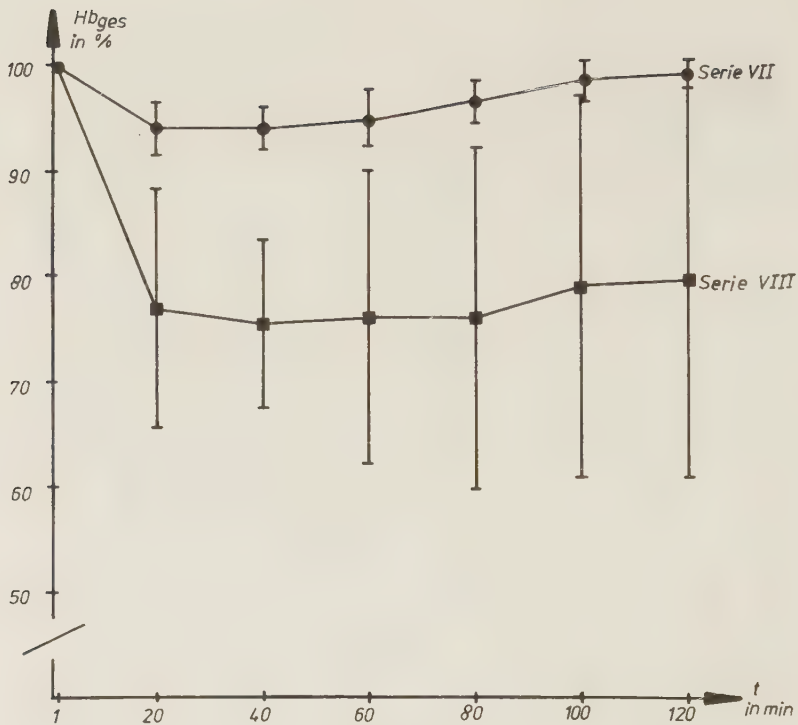


Abb. 31: Gesamthämoglobin (Hb_{ges}) in % des Einminutenwertes der Kontrollgruppe (Serie VII) sowie der Gruppe neuraminidase-inkubierter Rattenerthrozyten ohne Plasmainkubation (Serie VIII)

3.7.4. Versuche mit in vivo gealterten Erythrozyten

3.7.4.1 Trennung von Erythrozyten mittels Dichtezentrifugation

Rattenerthrozyten wurden wie beschrieben getrennt (siehe 2.2.2.) und in drei Fraktionen aufgeteilt perfundiert. Pro Fraktion wurden 6 Perfusionsversuche durchgeführt. Die Fraktion I war anreichert mit jungen, die Fraktion II mit reifen, die fraktion III mit alten Erythrozyten. Die Anteile der jeweiligen Fraktionen am insgesamt getrennten

Hämoglobin betrugen: I: 11,88%, II: 75,27%, III: 12,86%
(siehe B, 3.4.1.)

Entnahme- zeiten (Minuten)	Serie X		Serie XI		Serie XII	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
20	93,4	9,9	99,4	2,4	99,8	5,1
40	87,5	13,1	102,7	9,5	101,9	5,3
60	89,6	13,9	103,2	13,7	99,2	9,9
80	90,3	9,2	103,8	12,9	98,3	8,2
100	90,9	7,4	104,8	11,1	99,9	8,4
120	90,3	9,1	104,7	11,8	100,3	9,4

Tabelle 31: Gesamthämoglobin (Hb_{ges}) in % des Ausgangswertes bei Perfusionen junger (Serie X), reifer (Serie XI) und alter (Serie XII) homologer Rattenerythrozyten, getrennt mittels Dichte zentrifugation im Verfahren nach MURPHY.

Wie auch aus Tabelle 31 ersichtlich ist, nehmen die Hämoglobinkonzentrationen bei den Perfusionen mit jungen Erythrozyten stärker ab als bei reifen und alten roten Blutzellen. Durchgehende signifikante Unterschiede innerhalb der Perfusionsserien ließen sich jedoch nicht berechnen.

Auch eine einstündige Ultrazentrifugation konnte den Erythrozyten keine für die Phagozytosen der Leber erkennbare Schäden beibringen.

Zwischen der aufgeführten Perfusionsserie der reifen Zellen XI und der Gruppe der homologen Erythrozyten (Serie VI) ließ sich ebenfalls kein statistisch nachweisbarer Unterschied finden.

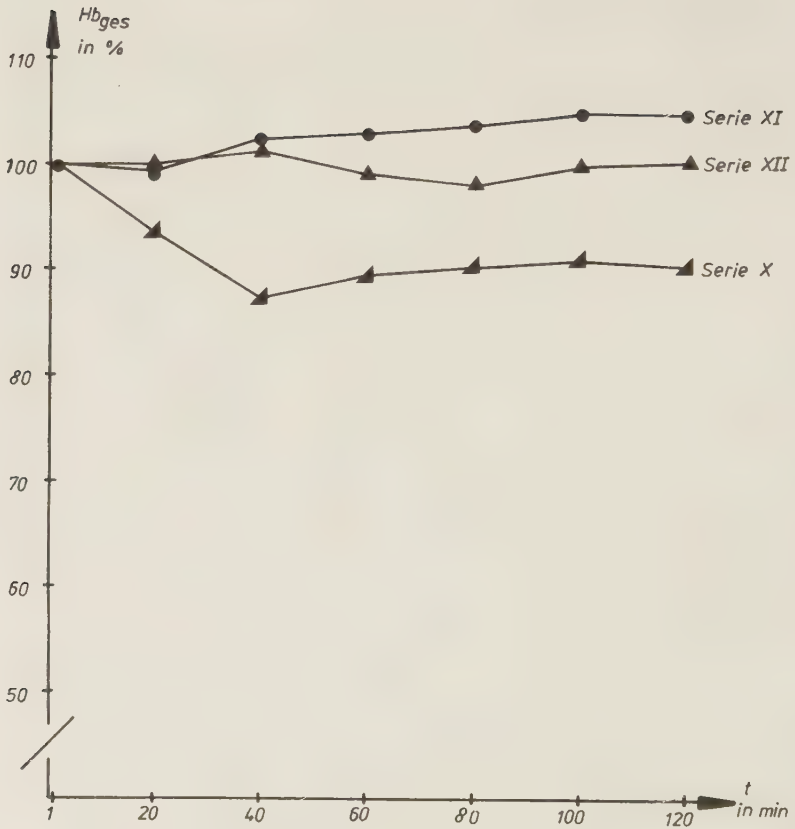


Abb. 32: Gesamthämoglobin (Hb_{ges}) in % der Einminutenwerte bei Perfusionen junger (Serie X), reifer (Serie XI), sowie alter (Serie XII) homologer Rattenerythrozyten, getrennt mittels Dichtezentrifugation nach dem Verfahren von MURPHY.
(Standardabweichungen siehe Tabelle 31)

3.7.4.2 Trennung von Erythrozyten mit dem Elutriationsrotor

Rattenerythrozyten wurden, wie beschrieben, getrennt (siehe 2.3.) und in drei Fraktionen aufgeteilt perfundiert. Pro Fraktion wurden 6 Perfusionsversuche durchgeführt. Fraktion I (Serie XIII) war mit alten, Fraktion II (Serie XIV) mit reifen und Fraktion III (Serie XV) mit jungen Erythrozyten angereichert.

Die Anteile der jeweiligen Fraktionen am insgesamt getrennten Hämoglobin betrugen im Mittel: I: 15,34%, II: 75,22%, III: 9,44% (siehe C, 3.5.).

Entnahme- zeiten (Minuten)	Serie XIII		Serie XIV		Serie XV	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
20	97,4	13,0	99,0	28,0	102,3	6,9
40	95,4	13,5	90,6	23,3	105,1	9,1
60	95,2	13,4	92,2	21,3	104,5	10,1
80	98,3	13,9	95,7	15,6	105,6	12,8
100	100,9	15,3	99,8	13,4	107,6	12,5
120	103,4	13,4	101,2	13,2	106,9	11,8

Tabelle 32: Gesamthämoglobin in % des Einminutenwertes bei Perfusionen alter (Serie XIII), reifer (Serie XIV) sowie junger (Serie XV) Rattenerythrozyten, getrennt mit dem Elutriationsrotor.

Innerhalb der Perfusionsserien XIII und XIV fand jeweils zu Beginn einer Perfusion ein Abfall der Hämoglobinkonzentration statt, der im Laufe des Versuchs wieder ausgeglichen wurde.

Zwischen den Serien ließ sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied feststellen.

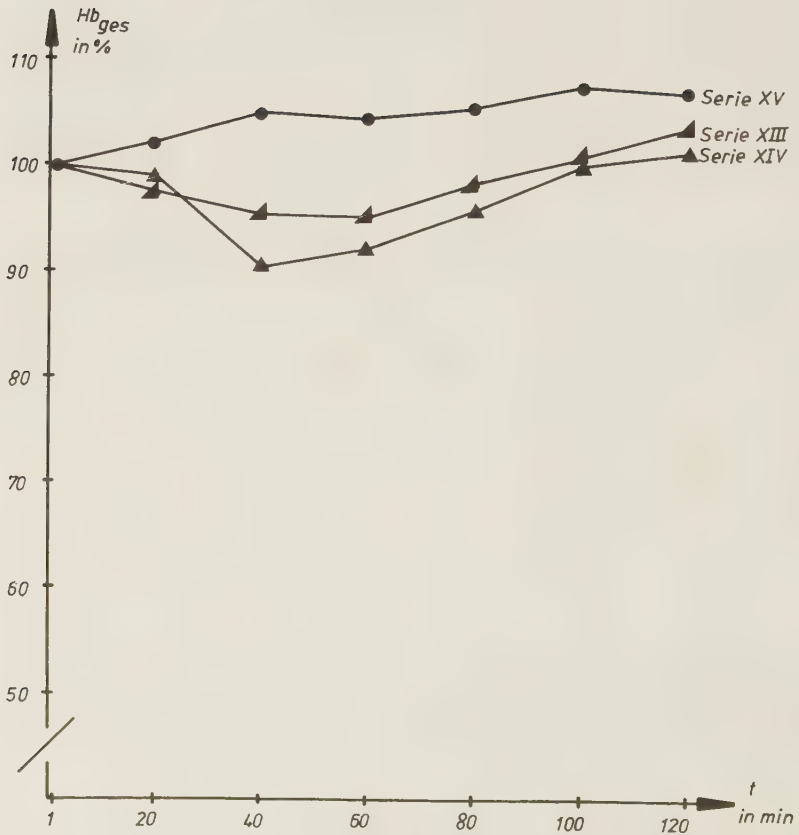


Abb. 33: Gesamthämoqlobin (Hb_{ges}) in % des Einminutenwertes bei Perfusionen alter (Serie XIII), reifer (Serie XIV) und junger (Serie XV) Rattenerythrozyten getrennt mit dem Elutriationsrotor (Standardabweichungen in Tabelle 32).

3.8. Kinetik der Phagozytose von Erythrozyten

BIÖZZI (2) gibt für die Phagozytose von Kohlepartikeln am intakten Organismus eine Kinetik an, die folgender Exponentialgleichung folgt:

$$C(t) = C_0 \times 10^{-kt} \quad /10/$$

Dabei sind $C(t)$ die Konzentration der Kohlepartikel zur Zeit t , C_0 ihre Konzentration zur Zeit $t = 0$. K wird als Phagozytoseindex bezeichnet.

Bei halblogarithmischer Darstellung entsteht daraus eine Gerade:

$$\lg C(t) = -k \times t + \lg C_0 \quad /11/$$

Ersetzt man $\lg C(t)$ durch y , $-k$ durch A und $\lg C_0$ durch B , so wird dies noch deutlicher:

$$y = A \times t + B \quad /12/$$

In den Serien III, IV und XVII dieser Arbeit wurden ausgeprägte Abfälle der Gesamthämoglobinkonzentrationen, beziehungsweise der Zellzahl des Perfusats beobachtet. Bei den Serien VIII und IX fand ein signifikanter Abfall innerhalb der ersten 60 Minuten statt. Bei der Serie IV wurden die Werte für die Entnahmen bei 80 - 120 Minuten für kinetische Betrachtung nicht mehr berücksichtigt, da sie bereits außerhalb der Meßgenauigkeit der Zellzahlbestimmung lagen.

Durch die Punktepaare aus $\lg C(t)$ und der dazugehörigen Zeit läßt sich eine Gerade mit einem minimalen Abstand zu den jeweiligen Punktepaaren legen, die Regressionsgerade. Der Korrelationskoeffizient r gibt an, ob diese Gerade gut mit der Menge der Wertepaare übereinstimmt ($r = \pm 1$) oder nicht ($r = 0$) (siehe auch 2.7.1.).

Aus Tabelle 33 wird ersichtlich, daß der Korrelationskoeffizient r jeweils nahe bei -1 liegt, also eine gute Übereinstimmung der Wertepaare mit der Regressionsgeraden gegeben ist. Dies läßt vermuten, daß auch für die Phagozytose von Erythrozyten eine Exponentialgleichung vom Typ der Gleichung /10/ gilt. Auch am intakten Organismus kann diese Kinetik beispielsweise für desialysierte Erythrozyten gefunden werden (40).

Serie	A	B	r
III	- 0,0052	1,9608	- 0,9911
IV	- 0,0271	1,9996	- 0,9989
XVII	- 0,0034	1,9473	- 0,9692
VIII	- 0,0031	1,9854	- 0,8946
IX	- 0,0028	1,9904	- 0,9334

Tabelle 33: Zusammenstellung der Bestimmungsgrößen A und B der Regressionsgeraden und der dazugehörigen Korrelationskoeffizienten r der jeweiligen Serien.

Dem Phagozytoseindex entspricht der negative Wert von A (siehe oben). Daraus läßt sich die Halbwertszeit des Abfalls der jeweiligen Bestimmungsgröße (Gesamthämoglobin, Zellzahl) errechnen:

$$T/2 = \frac{\log 2}{k} \quad \text{"/13/}$$

Serie	k	T/2
III	0,0052	57,89
IV	0,0271	11,11
XVII	0,0034	88,54
VIII	0,0031	97,11
IX	0,0028	107,51

Tabelle 34: Phagozytoseindex k und Halbwertszeit T/2 in Minuten der aufgeführten Serien.

Es ergeben sich zum Teil stark unterschiedliche Halbwertszeiten, die auf unterschiedliche Mechanismen der Erkennung oder Aufnahme der perfundierten Partikel hindeuten könnten.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann auch eine halblogarithmische Darstellungsweise der Ergebnisse vorgenommen werden.

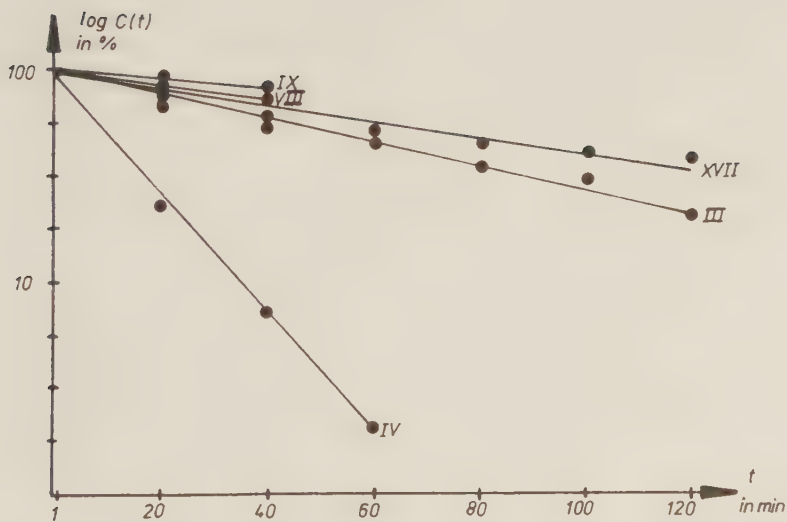


Abb. 34: Darstellung der Serien III, IV, VIII, IX und XVII in halblogarithmischer Weise.

Gegen die Zeit wurde der Logarithmus der relativen Konzentrationen in % aufgetragen.

4. Diskussion

4.1. Das Modell der isoliert perfundierten Rattenleber

Ziel dieses Modells ist es, über den Versuchszeitraum hinweg ein annähernd physiologisches Funktionieren des isolierten Organs zu gewährleisten. Die wohl wichtigste Voraussetzung dafür stellt ein ausreichender intrazellulärer Energiestoffwechsel dar. Auch die Phagozytose von Erythrozyten durch die von Kupffer'schen Sternzellen der Leber benötigt Energie (75). Für eine Perfusionszeit von zwei Stunden kann dies nur durch Zufuhr von Sauerstoff und eine funktionierende Atmungskette ermöglicht werden.

Bei den hier gewählten Bedingungen wird der Sauerstoff auf zwei Arten zur Leber transportiert: In Erythrozyten gebunden und physikalisch gelöst im Perfusionsmedium.

Der in Erythrozyten gebundene Sauerstoff läßt sich mittels der Hüfner'schen Zahl (1 Gramm Hämoglobin bindet 1,34 ml O_2), der eingesetzten Menge an Hämoglobin (41,12 mg/100 ml im Mittel bei 74 Experimenten, siehe 3.2.1.) und der Flußrate (5,96 ml/Gramm Lebertrockengewicht, siehe 3.3.2) berechnen. Danach werden 0,21 μ mol Sauerstoff pro Minute und Gramm Lebertrockengewicht von den Erythrozyten transportiert.

Die Menge an physikalisch gelöstem Sauerstoff errechnet sich aus dem Henry-Dalton'schen Gesetz (47), dem Bunsen'schen Löslichkeitskoeffizienten für Wasser und Sauerstoff bei der Perfusionstemperatur von 28°C, sowie dem Volumen von 1 mol O_2 bei dieser Temperatur. Bei einer Flußrate von 5,96 ml pro Gramm Lebertrockengewicht ergibt sich daraus, daß 4,83 μ mol Sauerstoff pro Gramm Lebertrockengewicht physikalisch gelöst transportiert werden. Dies entspricht mehr als der 20fachen Menge O_2 , die durch die eingesetzten Erythrozyten befördert werden kann. Nach Phagozytose von roten Blutzellen steigt dieser Faktor noch weiter an. Die Sauerstoffversorgung erfolgt in der vorgestellten Versuchsanordnung weitgehend nach dem Modell der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber.

Die ausreichende Sauerstoffversorgung der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber erweist sich jedoch als eines der größten Probleme dieses Versuchsmodells (51).

Die O_2 -Versorgung hängt ab von der Menge des antransportierten Sauerstoffs, von der Flußrate und von der Menge des physikalisch im Perfusat gelösten Sauerstoffs. Letztere steigt mit sinkender Temperatur des Lösungsmittels. Bei niedrigen Temperaturen wird außerdem die Stoffwechselaktivität der Leber und damit ihr Sauerstoffverbrauch herabgesetzt. Andererseits wird bei Temperaturen unter $4^{\circ}C$ (90) beziehungsweise $20^{\circ}C$ (90, 89, 91) über eine Hemmung der Phagozytose berichtet, was natürlich hier vermieden werden sollte.

Auch die bei der Praeperfusion (siehe 2.1.4.4) verwendete substratfreie Grundlösung diente dazu, den Sauerstoffverbrauch durch die Stoffwechselaktivität der Leber zu senken. Dies stützt sich auf Literaturhinweise, die bei Zugabe von Substraten wie Lactat im Perfusionsmedium eine erhöhte Sauerstoffutilisation der Leber nachweisen (74).

Der physiologische Blutzufluß durch die Pfortader zur Leber liegt zwischen 1,0 und 1,5 ml pro Gramm Leberfrischgewicht und Minute (107). Bei den hier durchgeführten Perfusionen betrug der Zufluß an Perfusionsmedium 5,96 ml/g Lebertrockengewicht und Minute.

Ein Vergleich zwischen beiden Gewichtsangaben wird durch folgende Hinweise ermöglicht:

- a) Das Lebertrockengewicht beträgt 1,07 % des Rattengewichts (siehe 3.3.1. und 128);
- b) Das Leberfrischgewicht beträgt etwa $1/15$ des Rattengewichts (20).

Die daraus errechnete Flußrate pro Gramm Leberfrischgewicht beträgt bei der vorgelegten Versuchsanordnung 1,6 ml/min. Sie liegt somit an der oberen Grenze physiologischer Leberdurchblutung.

Eine weitere Steigerung auf über 10 ml pro Gramm Lebertrockengewicht und Minute (ca 60 ml/min. totale Flußrate) führte

in orientierenden Vorversuchen zu petechialen Einblutungen in das Leberparenchym. Eine weitere Erhöhung auf 60 und 72 ml/min zieht, wie aus ultrastrukturellen Untersuchungen hervorgeht, Schäden am Endothel wie an den Hepatozyten nach sich (113).

Auch die Phagozytose wird von der Flußrate beeinflusst. Es besteht eine umgekehrte Korrelation zwischen Blutflußgeschwindigkeit und Intensität der hepatischen Phagozytose für kolloidale Partikel (103).

Auf eine weitere Verbesserung der Sauerstoffversorgung durch gleichmäßigere Perfusion aller Leberläppchenanteile mittels Rückstau im ableitenden Katheter (64) wurde hier verzichtet.

Perfusionstemperatur, Flußrate und Zusammensetzung des Perfusionsmediums wurden also im Sinne eines Kompromisses gewählt. Einerseits sollte eine weitestgehende Annäherung an physiologische Verhältnisse gewährleistet werden, andererseits mußten die Erfordernisse des Versuchsmodells, insbesondere die der ausreichenden Sauerstoffversorgung, beachtet werden. Zur Kontrolle diente eine Reihe biochemischer Parameter im Perfusat. Wegen des relativ großen Perfusionsvolumens spiegelten diese Werte natürlich nicht den aktuellen Leberstoffwechsel wider, sondern einen Querschnitt im Zeitraum zwischen den Probenentnahmen. Ihre Bedeutung für die Leberperfusion soll kurz besprochen werden:

Kalium (siehe 3.1.1.)

Eine Erhöhung der Kaliumkonzentration im Perfusionsmedium wird in meßbarem Umfang nur durch Zustrom aus dem intrazellulären Raum der Rattenleber erklärbar. Ein Ausstrom aus (geschädigten) Erythrozyten konnte durch die Ergebnisse der Leerperfusionen für die vorliegenden Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden. Als Ursache für den Ausstrom von Kaliumionen aus dem Zytoplasma der Leberzellen in das Perfusat sind vor allem eine verminderte Aktivität der energieabhängigen Natrium-Kalium-Pumpe der Zellmembran und schließlich auch der Zelluntergang verantwortlich.

Als weitere Folge der verminderten Aktivität der Ionenpumpe kommt es zum Einstrom von Natriumionen und Wasser in die

Zelle, was zu hydropischer Schwellung und Vacuolenbildung führen kann (113). Daraus resultieren eine Verlängerung der O_2 -Diffusionswege, Desintegration der Zellkompartimente, damit eine diffuse Verteilung der Enzyme und eine weitere Verminderung der intrazellulären Energiegewinnung. Werden diese Veränderungen nicht durch ausreichende Sauerstoffzufuhr aufgehalten, so kommt es schließlich zum Zelltod. Aus diesem Grunde wurde von verschiedenen Autoren (31, 113, 133) ein starkes Anwachsen der Kaliumkonzentration im Perfusat als Indikator für unzureichende intrazelluläre Energiegewinnung wegen Hypoxie angesehen.

Die Sauerstoffversorgung stellt jedoch nicht den einzigen die Kaliumkonzentration beeinflussenden Faktor dar. So fand SCHMUCKER (114) bei Albuminzusatz im Perfusionsmedium eine stärkere, bei Verwendung von Rattenblut eine geringere Freisetzung (113) von Kaliumionen. Veränderungen des pH-Wertes im Perfusionsmedium waren ebenfalls denkbar.

Wie aus 3.1.1. für Gruppe C zu entnehmen ist, war bei 85 Leberperfusionen nach einer Stunde noch keine Erhöhung der Kaliumkonzentration zu verzeichnen. Nach einer weiteren Perfusionsstunde konnte, verglichen mit dem Ausgangswert, eine Konzentrationserhöhung um 0,44 mval/l von Perfusat gemessen werden. Die Perfusion unter anoxischen Bedingungen hätte weitaus größere Anstiege hervorgerufen (113). Dies spricht also für eine ausreichende Energiegewinnung der Leberzellen und eine weitgehend stabile Aktivität der Natrium-Kalium-Pumpe der Zellmembran.

Glucose (siehe 3.1.2.)

Die Leber nimmt als Speicher und Verteiler für Glucose, als Mittler zwischen periodischer Glucoseanflutung durch die Pfortader und den auf eine kontinuierliche Anlieferung angewiesenen Zellen (Nervensystem, Nierenmark, Erythrozyten) einen wichtigen Platz in der Glucosehomöostase ein (47). Auch wegen ihrer zentralen Stellung im Energiehaushalt der Leber wurde die Glucosekonzentration im Perfusionsmedium bestimmt. Ihr Anstieg während der Perfusion (siehe 3.1.2.) kann wegen der ebenfalls wachsenden Lactatkonzentration (siehe 3.1.4.) nicht durch eine Gluconeogenese aus Milchsäure erklärt werden.

In Übereinstimmung mit den Überlegungen von BRÜMME (20) muß eine Glycogenolyse angenommen werden, die einerseits für die Erhöhung der Glucose im Perfusat verantwortlich zu machen ist, sowie andererseits durch anschließende anaerobe Glycolyse eine Erhöhung der Lactatkonzentration im Perfusat bedingt.

Die Pyruvatkonzentrationen erreichten gegen Ende der Perfusionszeit annähernd ihre Ausgangswerte (siehe 3.1.5.). Eine anfängliche Verminderung der Pyruvatmenge wurde durch Abgabe aus der Zelle während der Versuchsdauer wieder ausgeglichen (siehe 3.1.10.).

Aus diesen Beobachtungen kann folgende Bilanz der Glykogenolyse aufgestellt werden:

13,18 μmol Glucose/g Leberfrischgewicht (entsprechend der Glucoseerhöhung im Perfusat, siehe 3.1.10) und

10,49 μmol Glucose/g Leberfrischgewicht (entsprechend der Lactatzunahme im Perfusat, siehe 3.1.10.)

mußten aus den Glycogenvorräten der Rattenleber mobilisiert werden.

Bei ad libitum gefütterten erwachsenen Ratten kann der Glycogengehalt der Leber auf 338 ± 62 μmol Glycosyleinheiten/g Leberfrischgewicht geschätzt werden (15).

Die insgesamt während des Versuchs abgegebenen 23,67 μmol Glucose pro Gramm Leberfrischgewicht entsprechen also 7,0% der Leberglycogenvorräte.

Diese stellen somit keinen beschränkenden Faktor bei der Energiegewinnung der isoliert perfundierten Rattenleber dieses Versuchsmodells dar.

GOI und GPI (siehe 3.1.3.)

Im intakten Organismus findet sich schon im Normalzustand ein niedriger Serumspiegel dieser Enzyme, welcher aus der laufend stattfindenden Zellmauserung resultiert (47).

In der vorliegenden Versuchsanordnung konnten diese Enzyme nur aus den Zellen der Leber, nicht aus Erythrozyten, in meßbarem Umfang in das Perfusat übertreten.

Das intrazelluläre Enzymmuster (der Quotient GOT/GPT) wird von drei Faktoren maßgeblich beeinflusst: Konzentrationsgefälle, Molekulargewicht und intrazelluläre Lokalisation (112). Während die GPT nur zytoplasmatisch vorkommt (101), findet man die GOT sowohl in den Mitochondrien (75%) als auch im Zytoplasma (25%) der Zelle (112). Ein für ein Zellkompartiment typisches Enzymmuster kann aus den Ergebnissen von 3.1.3. nicht abgeleitet werden. Die Aktivität der GOT pro Gramm Lebergewicht liegt um ca. 40% höher als die der GPT (47) und entspricht damit den unter 3.1.3. festgehaltenen Beobachtungen im Perfusat.

Weiterhin muß angenommen werden, daß die Höhe der extrazellulären Enzymaktivitäten auch abhängt von präparationsbedingten Schäden und Störungen im Energiestoffwechsel der Zelle. Ein Anstieg der Redoxquotienten stellt zwar einen empfindlichen und innerhalb von Sekunden reagierenden Parameter dar (107), sagt aber wenig über bereits abgelaufene Schädigungen der Integrität der Zellmembran aus. Unter diesem Gesichtspunkt kann die zusätzliche Bestimmung der Aktivitäten von Zellenzym als ergänzende Aussage verstanden werden.

Nach Ansicht von SCHMIDT (112) soll der Austritt von Zellenzymen einen sensibleren Indikator für eine Zellschädigung darstellen als das Auftreten morphologischer Veränderungen, markanter Abweichungen im intrazellulären Enzymmuster oder der Störungen der Gesamtfunktion der Leber. Die in dieser Arbeit ermittelten Enzymaktivitäten im Perfusat lagen im oder unterhalb des für hämoglobinfreie Leberperfusionen angegebenen Bereichs. Dies kann als Hinweis für die Aufrechterhaltung der Integrität der Zellmembran unter den hier verwendeten Perfusionsbedingungen angesehen werden.

Lactat und Pyruvat (siehe 3.1.4., 3.1.5. und 3.1.8.)
Diese beiden Verbindungen entstehen als Endprodukte der Glycolyse im Cytoplasma der Zelle. Das Enzym Lactat-dehydrogenase (LDH) katalysiert die Redoxreaktion:



Pyruvat kann intramitochondrial im Citratzyklus weiter abgebaut oder als Ausgangsstoff zur Neusynthese benutzt werden.

Lactat wird bei ausreichender Sauerstoffversorgung in der genannten Reaktion wieder in Pyruvat zurückverwandelt und so im Zellmetabolismus weiterverwendet. Wenn unter anaeroben Bedingungen eine Oxydation des $\text{NADH} + \text{H}^+$ in der Atmungskette nicht mehr ausreichend stattfinden kann, wird sich das Gleichgewicht der Reaktion (a) nach rechts verlagern. Dabei wird das Pyruvat abnehmen, das Lactat jedoch ansteigen. Deshalb gilt der Quotient aus Lactat und Pyruvat als Indikator für anaerobe Bedingungen, für Hypoxie oder Anoxie bei der Leberperfusion (51, 106, 107).

Eine Messung der Konzentrationen im Perfusionsmedium erweist sich dabei als repräsentativ für die intrazellulären Verhältnisse. SCHIMASSEK (108) konnte zeigen, daß die Konzentrationen von Lactat und Pyruvat der Leberzelle mit denen im Außenmedium übereinstimmen. Dasselbe gilt auch für Veränderungen der Konzentrationen (108).

SCHIMASSEK (106, 107, 108) erhielt bei aeroben Versuchsbedingungen bei der hämoglobinfreien Leberperfusion einen konstant bleibenden Quotienten von 10. Auch bei den entsprechenden hier durchgeführten Experimenten (Gruppe B, 3.1.8.) findet sich ein gleichbleibender Wert von 8 - 9. Diese gute Übereinstimmung mit den Angaben von SCHIMASSEK weist auf die ebenfalls ausreichende Sauerstoffversorgung der Leber unter den hier gewählten Versuchsbedingungen hin.

Bei der großen Gruppe der Leberperfusionsen mit Erythrozyten (siehe 3.1.8., Gruppe C) stellt sich der Gleichgewichtsquotient zwischen Lactat und Pyruvat bei 20 ein. Dies deutet auf eine grenzwertige Sauerstoffversorgung hin, die jedoch ausreichte, um auf einem höheren Niveau ein neues Gleichgewicht einzustellen. Ein Quotient von 20 kann zumindest bei Menschen noch als normal gelten (119).

Lactat-Konzentrationen von 5 mmol/l, wie sie am Ende der Versuche im Mittel im Perfusat vorlagen, werden beim Menschen unter körperlicher Anstrengung sogar um ein Vielfaches übertroffen. So wird auch die Einstellung eines Wertes von 20 noch als Hinweis auf eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Phagozyten der isoliert perfundierten Rattenleber angesehen.

Beta-Hydroxybutyrat und Acetoacetat (siehe 3.1.6., 3.1.7. und 3.1.9.)

Acetoacetat (D(-)-Beta-Ketobutytrat) und D(-)-Beta-Hydroxybutyrat entstehen zusammen mit Aceton bei der Ketogenese im Rahmen des Lipidstoffwechsels. Schon im physiologischen Zustand bei normaler Nahrungsaufnahme läßt sich im Blut von Säugetieren ein Ketonkörperspiegel von zirka 15 mg/l, ausgedrückt in Acetonäquivalenten, nachweisen (47). Bei unvollständigem Abbau von Fettsäuren kommt es zur vermehrten Bildung von Ketonkörpern, wobei das dabei entstehende Acetyl-CoA nicht in ausreichendem Maße im Citratzyklus, das $\text{NADH} + \text{H}^+$ nicht genügend in der Atmungskette umgesetzt werden kann (47). Beta-Hydroxybutyrat und Acetoacetat bilden ebenfalls eine Redoxreaktion, die mit der D(-)-Beta-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (Beta-HBDH) als katalysierendem Enzym folgende Reaktionsgleichung aufweist:



Im Unterschied zur Reaktion zwischen Lactat und Pyruvat findet die obige Reaktion intramitochondrial statt.

Beide sind jedoch abhängig vom Verhältnis $\text{NADH} + \text{H}^+ / \text{NAD}^+$ und damit, wie viele andere Redoxreaktionen, vom intrazellulären Redoxstatus und der Energiegewinnung in der Zelle.

Für die hämoglobinfrei perfundierte Rattenleber gibt KREBS (72) einen Wert von 1,0 bis 1,4 für den Quotienten aus Beta-Hydroxybutyrat und Acetoacetat an. In guter Übereinstimmung damit befinden sich die hier gewonnenen Ergebnisse der hämoglobinfreien Leberperfusion (Gruppe B, siehe 3.1.9.), die zwischen 1,1 und 1,2 liegen.

Der Anstieg des Quotienten für die Leberperfusion mit Erythrozyten (Gruppe C, siehe 3.1.9.) muß als Verschiebung des intramitochondrialen Redoxpotentials im Sinne einer Anhäufung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ verstanden werden, wie bei dem Quotienten Lactat/Pyruvat ein Zeichen der grenzwertigen Sauerstoffversorgung.

Wegen der am Ende der Perfusion vorliegenden Konzentrationen von 50,7 mg/l Beta-Hydroxybutyrat (siehe 3.1.6., Gruppe C) und 29,6 mg/l Acetoacetat (siehe 3.1.7., Gruppe C) muß,

verglichen mit der oben angegebenen Zahl von 15 mg/l Aceton-äquivalenten im normalen Säugetierblut, von einer Ketonämie gesprochen werden. Eine Ketoazidose stellt sich unter den vorliegenden Versuchsbedingungen durch den im Perfusionsmedium beigefügten Puffer nicht ein, wie unter weitgehend identischen Bedingungen nachgewiesen wurde (128, 129).

Die genannten Parameter messen nicht nur getrennte Stoffwechselvorgänge der Zelle, sie hängen auch wechselseitig voneinander ab. So setzt eine intakte Energiegewinnung unter anderem eine intakte räumliche Anordnung der Enzyme voraus, also eine Aufrechterhaltung der zellulären Ultrastruktur - wofür wiederum Energie notwendig ist. Für die Redoxquotienten wurde eine ähnliche Abhängigkeit bereits beschrieben.

Es hätten noch weitere Kontrollparameter herangezogen werden können, zum Beispiel der pH des Perfusats, die Sauerstoffaufnahme der Leber, der Sauerstoffpartialdruck an der Oberfläche des Organs (64), Aktivitätsbestimmung anderer Enzyme u.v.m. Wegen der gegenseitigen Abhängigkeiten dieser Größen erweist es sich jedoch als ausreichend, zur Charakterisierung der Funktion des Organs als Ganzes eine repräsentative Auswahl zu treffen. Mittels der durchgeführten Bestimmungen wurde die Membranfunktion (GOT, GPT, K^+), das Cytoplasma (Lactat, Pyruvat) sowie der intramitochondriale Raum (Beta-Hydroxybutyrat, Acetoacetat) überprüft. Einen sensiblen Parameter der Energiegewinnung stellen die Redoxquotienten dar.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der eingangs erwähnte Kompromiß für die Sauerstoffversorgung erreicht wurde. Das Ansteigen der Redoxquotienten deutet auf eine grenzwertige Sauerstoffversorgung hin. Die Einstellung eines neuen Gleichgewichts besonders für Lactat/Pyruvat spricht dafür, daß keine Entgleisung des Zellmetabolismus stattfand. Die im Perfusat gemessenen Konzentrationen an Pyruvat und Lactat überstiegen zwar die unter Normalbedingungen vorliegenden Werte, lagen jedoch noch in einem Bereich, der bei Hunger, körperlicher Aktivität usw. ebenso vorkommen könnte. Die geringen Anstiege der Enzymaktivitäten sowie der Kaliumkonzentrationen im Perfusat zeugen von einer Aufrechterhaltung

der Membranfunktionen. Für die Perfusionszeit von zwei Stunden scheint damit unter den gewählten Perfusionsbedingungen eine ausreichende Energiegewinnung der Zellen gewährleistet gewesen zu sein.

4.2. Die isoliert perfundierte Leber als Phagozytosemodell für Erythrozyten

4.2.1. Spezielle Aspekte der Leberperfusion

Die bisher mit dem Modell der isoliert perfundierten Rattenleber durchgeführten Versuche dienten oft der Erforschung metabolischer Prozesse des Organs (49, 87). Doch wurde dieses Modell der Organperfusion auch bereits zu Phagozytoseversuchen verwendet (129). Als Phagozytosemodell für Erythrozyten, im besonderen zur Erforschung von Alterung und Alterungsmodellen in vivo, existieren noch keine experimentellen Arbeiten mit Perfusionen von isolierten Lebern. Die Phagozytose diente in dieser Arbeit zur Charakterisierung der Eigenschaft "erkennbar alt" (siehe 1.)

Als Maß der Sequestration wurde die Messung des Gesamthämoglobins (siehe 3.2.3.) im Perfusionsmedium herangezogen. Es handelt sich dabei um ein indirektes Verfahren, da aus dem Abfall des Probenhämoglobins nach Ausschluß apparatbedingter Einflüsse (siehe 3.2.2.) auf ein Verbleiben der Erythrozyten in der Leber geschlossen wird.

Die Sequestration von Erythrozyten durch die Leber beruht hauptsächlich auf zwei Mechanismen: Adhärenz und Phagozytose. Adhärenz wird jedoch nicht immer von Phagozytose gefolgt (90). So wird beispielsweise über eine Rezirkulation neuraminidase-behandelter jugendlicher Erythrozyten nach vorübergehendem Verschwinden aus der Zirkulation berichtet (9). Rezirkulation kann jedoch nur nach Adhärenz erfolgen, da nach Phagozytose eine Verschmelzung mit Lysosomen und damit ein intrazellulärer Abbau der Erythrozyten stattfindet. Eine Differenzierung dieser beiden Phänomene wurde von anderen Autoren durch mechanische Trennung angelaagerter Erythrozyten an Makrophagen durch kräftiges Schütteln des Inkubationsansatzes (60),

hypotone Hämolyse anhaftender roter Blutzellen (30) oder Auszählen von ausschließlich intrazellulär liegenden Erythrozyten (69) versucht.

Da aber Phagozytose Adhärenz, und damit ein Erkennen von Zellen voraussetzt, wurde beim hier vorgelegten Modell zwischen Anlagerung und Phagozytose nicht unterschieden.

Die Differenzierung erscheint auch bei der Leberperfusion durchaus möglich, beispielsweise mit der hypotonen Hämolyse.

Die Existenz von Adhärenz und Phagozytose wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen (siehe Abb.25, 28, 29) aufgezeigt. Während glutaraldehydfixierte rote Blutzellen vor allem intrazellulär beobachtet wurden, fand sich bei autologen Erythrozyten fast ausschließlich Adhärenz. Dieser Vorgang ist damit für den Abfall des Gesamthämoglobins bei der Perfusion autologer roter Blutzellen verantwortlich (siehe 3.7.2.2). Bei Phagozytoseversuchen mit Zellkulturen von Rattenperitonealmakrophagen sowie jungen und alten Erythrozyten wurden 15 - 25% angelagert und 2 - 3 % phagozytiert (36).

Weiterhin zeigte sich, daß freies Hämoglobin von den isoliert perfundierten Rattenlebern nicht aufgenommen wird (siehe 3.2.1.). Im intakten Organismus wird durch Hämolyse freiwerdendes Hämoglobin an Haptoglobin gebunden. Der stabile Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex wird schnell aus der Zirkulation entfernt, wobei die Leber, besonders aber die Hepatozyten, für diesen Vorgang verantwortlich zu sein scheinen (17). Es wird ein spezifischer Rezeptor der Leberparenchymzelle für den Komplex postuliert (66). Bei den hier durchgeführten Versuchen konnte festgestellt werden, daß dieser Rezeptor oder andere Aufnahmemechanismen auf Hämoglobin allein nicht ansprechen. Andere Faktoren, wie das Haptoglobin, scheinen unbedingte Voraussetzung für die Entfernung von freiem Hämoglobin aus der Zirkulation zu sein.

Die Aufnahme von Partikeln in mononukleäre Makrophagen, wie die von Kupffer'schen Sternzellen der Leber, kann über verschiedene Rezeptoren erfolgen, die etwas willkürlich mit "spezifisch" und "unspezifisch" bezeichnet werden (136, 86). Zu den spezifischen Rezeptoren werden Bindungsstellen für

IgG gerechnet (55), über die mit IgG opsonierte Erythrozyten aufgenommen werden können (90, 91).

Über Bindungsstellen für den Komplementanteil C3b können mit IgM und Komplement inkubierte Erythrozyten erkannt werden (90). Bei unstimulierten von Kupffer'schen Sternzellen wird von diesen Rezeptoren jedoch nur Adhärenz vermittelt (90). Neben diesen auf den Partikeln haftenden Opsoninen werden auch andere Serumbestandteile beschrieben, die auf Makrophagen haften, typhsinempfindlich sind (75), beziehungsweise aus dem Serum ergänzt werden können (126). Beim unspezifischen Mechanismus der Aufnahme handelt es sich um direkte Interaktionen der Partikel mit der Zellmembran. Es scheint sich dabei jedoch wieder um eine Vielzahl von Bindungsstellen zu handeln, die sich gegenseitig beeinflussen (13). Zu Partikeln, die über diesen Mechanismus aufgenommen werden, zählen Tusche (16), Latex und glutaraldehydfixierte Erythrozyten (13). Bei den hier durchgeführten Versuchen muß besonders bei den Serien III, IV und XVII eine Aufnahme von Erythrozyten in die Leber über den sogenannten "unspezifischen" Mechanismus angenommen werden.

Nach BIOZZI (16) folgt die Kinetik der Phagozytose von Kohlepartikeln am intakten Organismus einer Exponentialgleichung. Für die hier benutzten Teilchen mit ebenfalls unspezifischem Erkennungsmechanismus (glutaraldehydfixierte, hämolysierte und menschliche Erythrozyten) ließ sich ebenfalls eine exponentielle Aufnahmekinetik errechnen (siehe 3.8.).

Die Halbwertszeiten lagen zwischen 11,11 und 107,51 Minuten. Eine Verminderung der Ausgangskonzentrationen an Erythrozyten würden Gleichung /9/ zufolge (siehe 2.7.3.) den Phagozytoseindex erhöhen und damit die Halbwertszeit (siehe 3.8., Gleichung /13/) verringern. Dem setzt jedoch die Nachweismöglichkeit für Hb_{ges} Grenzen. Eine Erhöhung der Ausgangskonzentrationen an roten Blutzellen dagegen würde die Halbwertszeit noch weiter verlängern, sodaß meßbare Unterschiede innerhalb von 2 Stunden Perfusionszeit durch Abnahme der Ausgangswerte schwerer zu erzielen wären. Die gewählte Menge von $2,15 \times 10^9$ Erythrozyten in 150ml Perfusat zu Beginn des Versuchs erwies sich innerhalb dieser Grenzen als angemessen.

MUNTHE-KAAS (89) schätzt die Anzahl der von Kupffer'schen Sternzellen auf $77 \times 10^6/100$ g Rattengewicht. Dem Gewicht der hier verwendeten Ratten von 450 g entsprechend ließe dies auf $3,47 \times 10^8$ von Kupffer'sche Sternzellen pro Leber schließen. Auf eine von Kupffer'sche Sternzelle kommen 6 Erythrozyten. KAY (60) setzt 10 Erythrozyten pro Makrophage ein. CELADA (22) ermittelte für Monozyten aus menschlichem Blut gar ein Verhältnis von 20 Erythrozyten pro phagozytischer Zelle als für die Phagozytoseaktivität am günstigsten. Von den Zellen der Monozytenkulturen werden dabei jedoch im Mittel nicht mehr als 5 rote Blutzellen/Makrophage eliminiert. Weniger die Anzahl der Rezeptoren als vielmehr die Zellgröße der phagozytierenden Zelle stellt den limitierenden Faktor dar (90).

Bei einem Verhältnis von 6 Erythrozyten zu einer von Kupffer'schen Sternzelle wird deren Aufnahmekapazität nicht überstiegen (90), sodaß eine nicht stattfindende Phagozytose durch Überlastung der Leberphagozyten nicht erklärt werden kann. Nach einer Sättigung mit roten Blutzellen benötigen die von Kupffer'schen Sternzellen etwa 40 Stunden, um wieder ihre ursprüngliche Phagozytoseaktivität zu erreichen (90).

Die Halbwertszeiten für Tuscheperfusionen (129), wie auch IgG (60, 90) opsonisierte Erythrozyten liegen unter oder knapp über einer Stunde. Auch die hier (siehe 3.8.) gefundenen Halbwertszeiten bei etwa entsprechendem Verhältnis zwischen Makrophagen und roten Blutzellen lagen in dieser Größenordnung. Bei der hier benutzten Ausgangskonzentration von Erythrozyten wäre also eine Verlängerung der Perfusionsdauer über 2 Stunden hinaus nicht sinnvoll. Das Modell der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber selbst kann mindestens 3-4 Stunden lang benutzt werden (107), mit anderen Sauerstoffträgern noch länger (74).

Bei aller Bemühung um die Anpassung des Modells der perfundierten Rattenleber an die Verhältnisse in vivo darf nicht außer Acht gelassen werden, daß die extrakorporale Perfusion eines Organs immer eine unphysiologische Maßnahme darstellt (21). Zwar scheint die Phagozytoseaktivität der isolierten Rattenleber den Verhältnissen in vivo zu ähneln (46), doch

beeinflussen mehrere Faktoren den Versuch. So verlängern z.B. chirurgischer Streß (103) und Heparin-gabe (14) die Halbwertszeiten.

Bei Berücksichtigung dieser Einwände kann die isolierte Rattenleber als Phagozytosemodell für Erythrozyten sehr wohl akzeptiert werden.

4.2.2. Herkunft der Erythrozyten

Auf der Suche nach einer geeigneten Erythrozytenpopulation für die Perfusionen mit möglichst genau definierten Veränderungen an den roten Blutzellen wurden autologe, homologe und heterologe Erythrozyten perfundiert.

Die Perfusion heterologer, in diesem Falle menschlicher Erythrozyten (siehe 3.7.2.1) führte bereits ohne weitere präparative Veränderungen oder Opsonisierung mit Immunglobulinen zur Entfernung aus dem Perfusionsmedium.

Menschliche rote Blutzellen sind bereits von ihrer Größe her mit einem mittleren Zellvolumen (MCV) von $90 \mu\text{m}^3$ fast doppelt so groß wie Rattenerythrozyten. Aus den mittleren Fraktionen der drei durchgeführten Trennungen errechnete sich für Rattenerythrozyten ein MCV von im Mittel $51 \mu\text{m}^3$. Der Einfluß der Zellgröße auf die Phagozytoserate wurde bereits erwähnt (45). Die Phagozytose heterologer Erythrozyten nach Opsonisierung mit IgG oder IgM und C3b wurde nachgewiesen (90). Da bei Serie XVII keine Inkubation mit diesen Phagozytosemediatoren durchgeführt wurde und auch die Leber in der Präperfusion von Rattenblut befreit wurde, hat eine Phagozytose ohne Vermittlung von Opsoninen stattgefunden.

Neben einem Einfluß der Größe könnten auch genetische Unterschiede in Betracht gezogen werden. So führt eine Zunahme der abstammungsmäßigen Verschiedenheit bei Phagozytoseexperimenten am Ganztier zur Verkürzung der Lebenszeit injizierter Erythrozyten (59). Die relativ hohen Standardabweichungen bei Perfusionen mit menschlichen Erythrozyten könnten ebenfalls als Hinweis auf genetische Faktoren gewertet werden. Diese Einflüsse würden sich bei der Untersuchung der Erythrozytenalterung störend auswirken, weshalb für die weiteren Perfusionsversuche Rattenerythrozyten benutzt wurden.

Bei der Verwendung autologer Erythrozyten (siehe 3.7.2.2) können genetische Einflüsse auf die Phagozytose ausgeschlossen werden.

Obwohl versucht wurde durch vergleichsweise geringe präparative Manipulationen die Alterationen der roten Blutzellen zu minimieren, nahm die Konzentration der Erythrozyten im Perfusionsmedium um 15% ab.

Die Ursache ist wohl in einer minimalen Schädigung der Erythrozyten zu sehen, wobei die Elimination wie aus den elektronoptischen Bildern ersichtlich, auf Adhärenz beruht und nach ca. 40 Minuten weitgehend abgeschlossen ist. Untermauert wird diese Annahme durch die vermutlich allerdings nicht signifikante Phagozytose junger Erythrozyten (siehe Serie X, 3.7.4.1), die auch - als die empfindlicheren Zellen - eher geschädigt werden (52).

Bei der Perfusion homologer Rattenerythrozyten (siehe 3.7.2.3) wurden keine Unterschiede zum Verhalten autologer roter Blutzellen festgestellt. Das Fehlen einer unterschiedlichen Lebenserwartung zwischen isologen und homologen Erythrozyten wurde für Mäuse bei Versuchen am Ganztier nachgewiesen (59).

Während bei diesen Versuchen mit homologen Erythrozyten am Ganztier immunologische Einflüsse ebenfalls keine Rolle spielten, kann für die hier vorgelegten Perfusionsversuche lediglich die direkte Erkennung homologer Erythrozyten durch die Phagozyten ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu menschlichen Erythrozyten nimmt die Ausgangshämoglobinkonzentration bei Perfusionen mit homologen roten Blutzellen nur geringfügig ab. Um solche immunologischen Unterschiede auch bei den Versuchen mit Plasmainkubation auszuschließen, wurde ausschließlich erythrozytenautologes Plasma verwendet. Dabei wurden ebenfalls keine Unterschiede zur Gruppe der homologen Rattenerythrozyten gefunden (siehe Serie VII, 3.7.3.3).

Für den allerdings nur geringen Abfall des Hb_{ges} in den ersten 40 Minuten der Perfusion (4%) können, wie für autologe Erythrozyten begründet, minimale Schäden bei der Präparation sowie phagozytosewürdige Zellen in Frage kommen. Ein signifikanter Unterschied zur Gruppe der Leerperfusionen ließ sich jedoch nicht ermitteln.

4.3. Trennverfahren

Methoden zur Trennung von Erythrozyten in verschiedene Altersstufen mittels Ultrazentrifugation sind die am häufigsten benutzten Verfahren. Für sie liegen auch Kontrollen der Gültigkeit der Trennung mittels Markierungsversuchen vor (19, 52). Der Vergleich zweier Verfahren dieser Art, den Methoden nach MURPHY (92) und PLATT et al. (98), erbrachte eine weitgehende Übereinstimmung (siehe 3.4.).

Die Kontrolle der abgelaufenen Trennung läßt sich anhand einiger einfacher Bestimmungen leicht durchführen. In dieser Arbeit wurden das MCV, das MCH und das MCHC bestimmt (siehe 3.4.1.). Die Konstanz des MCH (92, 116), die Abnahme des MCV (92, 127) sowie die Zunahme des MCHC (23, 43, 92) stehen im Einklang mit den Angaben aus der Literatur. Sie stellen keine Artefakte der Zentrifugation dar (23).

Die jeweils größeren Unterschiede zwischen den Mittelwerten von MCV und NANA-Bestimmung bei der Trennung nach PLATT et al. deuten auf eine höhere Trennschärfe dieser Methode hin. Signifikante Unterschiede zur Methode nach MURPHY ließen sich jedoch nicht errechnen.

Die Methode nach MURPHY wurde in dieser Arbeit zur Gewinnung von Erythrozyten verschiedenen Alters für die Leberperfusion gewählt, da sie bei etwas geringer Trennschärfe nur 1/4 der Zeit benötigt, die die Methode nach PLATT et al. beansprucht. Auch für den Vergleich mit der Trennung nach dem Elutriationsprinzip bietet sich die Methode nach MURPHY an, da beide Verfahren etwa 1 Stunde dauern.

Bei beiden Verfahren zur Dichtentrennung nimmt das Alter der Erythrozyten von der obersten zur untersten Schicht hin zu. Eine unkritische Bezeichnung der obersten Fraktion als "junge", der mittleren Fraktion als "reife" und der untersten Fraktion als "alte" Erythrozyten ist jedoch nicht gerechtfertigt. Wie bei allen biologischen Parametern, so muß auch bei der Dichte der Erythrozyten von einer Normalverteilung ausgegangen werden (52). So müßten die einzelnen Schichten als angereichert mit alten, reifen oder jungen Erythrozyten gelten.

Die Verteilung der leicht zu identifizierenden Retikulozyten mag dies belegen (43, 52).

Die Elutriationszentrifugation ist eine Methode, die zur Auftrennung unterschiedlicher Zellen (68) dient. Sie kann auch zur Trennung von Erythrozyten gemäß ihres Alters herangezogen werden (siehe 2.3.).

Ein Vorteil dieser Methode besteht in der geringen Traumatisierung der Erythrozyten durch die niedrigen Rotordrehzahlen sowie geringer Scherkräfte auf die Membran der Zellen wegen der weniger dichten Packung der roten Blutzellen in der Trennkammer. Ein weiterer Vorzug besteht in der problemlosen Fraktionierung der getrennten Erythrozyten.

Ein Nachteil des Verfahrens liegt im relativ geringen Trennvolumen.

Die hämatologischen Charakteristika, das MCHC, besonders aber das MCV deuten darauf hin, daß eine Trennung in verschiedene Altersgruppen wirklich stattgefunden hat. Dabei erscheinen die alten Zellen in der ersten, die jungen in der letzten Fraktion angereichert. Eine weitere Untermauerung durch Versuche mit radioaktiver Markierung müßte noch durchgeführt werden. Alternativ kann die Bestimmung einer ausreichend großen Zahl von altersabhängigen Eigenschaften der Erythrozyten dies ersetzen.

Bei den drei Methoden wurde eine auf die insgesamt eingesetzte Hämoglobinmenge bezogene genaue Bestimmung der jeweiligen Fraktionsgröße der Trennung durchgeführt. Die Notwendigkeit dazu ergibt sich aus der Vergleichbarkeit der Trennverfahren miteinander sowie zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen. Die Eigenschaften alter, reifer und junger roter Blutzellen sollten ebenfalls immer unter Angabe der Fraktionsgröße erfolgen. Wegen der Konstanz der mittleren Menge an Hämoglobin pro Zelle (MCH) während des Alterns bietet sich neben der Zellzahl auch ein Vergleich der Fraktionen auf der Grundlage des Hämoglobins an. In dieser Arbeit erfolgen die Angaben deshalb als % Hämoglobin der Fraktion bezogen auf die insgesamt getrennte Menge an Hämoglobin.

4.4. Neuraminsäuregehalt von Erythrozytenfraktionen nach Dichtentrennung und Neuraminidasebehandlung

Der hier (siehe 3.4.2.) festgestellte höhere NANA-Gehalt von jungen und reifen gegenüber alten Erythrozyten bestätigt bereits in der Literatur gemachte Angaben (2, 41, 43, 116).

Bei der Trennung nach PLATT et al. beträgt der NANA-Gehalt der unteren Fraktion 74,2% der oberen, bei der Trennung nach MURPHY sind es 85,2% der oberen Fraktion. Ähnliche Angaben in der Literatur für menschliche Erythrozyten schwanken zwischen 95,8% (116) und 50% (8) - auch in Abhängigkeit von der Bezugsgröße der gemessenen NANA. Im allgemeinen wird jedoch eine Verringerung der NANA von 10 - 20% zwischen jungen und alten Zellen akzeptiert (34, 78). Dies entspricht in etwa den hier gefundenen Werten von 25,6% beziehungsweise 14,8%.

Die Bewertung dieser Beobachtung ist jedoch uneinheitlich. So findet YAARI (140) eine Abnahme der negativen Ladungsdichte auf alten Erythrozyten, also eine Verringerung der Flächen-dichte der NANA, die hauptsächlich für die negative Oberflächenladung verantwortlich zu machen ist (siehe auch 4.6.2.). SEAMAN (116) kann diese Beobachtung dagegen nicht nachvollziehen. Er findet eine Konstanz der Ladungsdichte.

PLATT (99) mißt eine Abnahme des Gehalts an N-Acetylneuraminsäure pro mg Glycophorin. LUTZ (78) dagegen findet einen unveränderten Gehalt an NANA bezogen auf Glycophorin der Zellmembran. BAXTER (12) gibt neben der Abnahme der NANA eine Verminderung auch anderer Oberflächenkohlenhydrate in alten Erythrozyten an. Ebenso kann BLADIER (18) zeigen, daß bei sieben untersuchten Kohlenhydraten der Erythrozytenmembran mit zunehmendem Alter eine Abnahme aller Moleküle der Zelle erfolgt. Mögliche Mechanismen zur Erklärung dieser noch kontrovers diskutierten Veränderungen könnten sein: Verlust ganzer Membranpartikel, damit auch Verlust vollständiger Glycoproteine (43), proteolytische Abspaltung von Teilen der Glycoproteine oder Einwirkung einer beziehungsweise mehrerer Glycosidasen. Eine Kombination der aufgeführten Mechanismen wäre natürlich ebenso denkbar.

Ein höherer NANA-Gehalt bei jungen verglichen mit reifen Erythrozyten (18, 132) konnte dagegen nicht nachvollzogen werden. Zwischen diesen beiden Gruppen konnte zwar kein signifikanter Unterschied errechnet werden, doch findet sich bei beiden Methoden der Dichtentrennung ein jeweils niedrigerer NANA-Gehalt der ersten Fraktion.

Diese ersten 10% der getrennten roten Blutzellen erweisen sich als angereichert mit jungen Erythrozyten und Retikulozyten (43, 53). Es existieren Hinweise, daß während des Reifungsprozesses der Retikulozyten diese Erythrozytenveränderungen eintreten, die Membranbestandteile (117, 139) wie auch intrazelluläre Enzymaktivitäten betreffen (100).

Bei der Alterstrennung von Rattenerythrozyten nach dem Gegenstromverfahren (84, 131) erscheinen die Retikulozyten in der ersten, die jungen Erythrozyten jedoch in der letzten Fraktion. Dieses, auch mit radioaktiv markierten Erythrozyten nachgeprüfte Verfahren (84), benutzt Unterschiede in der Oberflächenladung der Zellen für die Trennung der Erythrozyten (132). Die Oberflächenladung bei Erythrozyten steht jedoch in engem Zusammenhang mit deren Gehalt an N-Acetylneuraminsäure (33). Eine Gewinnung von Retikulozyten und sehr jungen Erythrozyten zusammen mit alten Zellen in den ersten Fraktionen könnte ein Hinweis auf deren verminderten NANA-Gehalt sein.

Auch Ergebnisse bei "Stress"-Makroretikulozyten mit vermindertem NANA-Gehalt (7) deuten auf eine Einbeziehung der N-Acetylneuraminsäure in diesem Prozess der Reifung hin.

Als Ort der Reifung wird die Milz diskutiert (7, 25).

BALDUINI (6, 8, 9) stellt nach Neuraminidasebehandlung von Retikulozyten sowie von jungen Erythrozyten eine Anlagerung von NANA an rote Blutzellen im Organismus, besonders in der Leber, zur Diskussion.

Die statistische Untermauerung oder Widerlegung der eingangs erwähnten Beobachtung über den verminderten Gehalt an Neuraminsäure junger Zellen wäre deshalb bedeutungsvoll.

Die Abspaltung membranständiger NANA durch das Enzym Neuraminidase hängt von der Aktivität im Inkubationsansatz ab (6, 41). Die hier auf enzymatischem Weg abgetrennte NANA betrug 90,4% der durch Säurehydrolyse abspaltbaren Menge (siehe 3.6.1.).

Während GATTEGNO (40) mit beiden Abspaltmethoden äquivalente Mengen und AMINOFF (4) mehr als 95% aus der Membran lösen kann, beobachtet BALDUINI (6) auch bei stärkerer Erhöhung der Enzymaktivität im Inkubationsansatz nur eine 85%-ige Abspaltung mit dem Enzym.

Immobilisierte Neuraminidase muß in höheren Konzentrationen verwendet werden, um ähnliche Mengen an Neuraminsäure aus der Membran abzuspalten (36). Dieser Unterschied kann als verschieden leichte Zugänglichkeit der NANA-Moleküle der Zellmembran interpretiert werden. Ebenso könnte der Unterschied zwischen Abspaltung mit freier Neuraminidase und Säurehydrolyse als Unerreichbarkeit eines Teils der NANA für das Enzym erklärt werden.

Interessant erscheint in diesem Zusammenhang noch, daß aus alten Erythrozyten etwa 50% weniger NANA enzymatisch abspaltbar ist als aus jungen Erythrozyten (2).

Ob es sich dabei ausschließlich um eine Folge der verminderten Menge an NANA der Membran handelt oder ob auch die Differenz der abspaltbaren Mengen mittels Säurehydrolyse und enzymatischer Abtrennung steigt, muß noch geklärt werden.

Die Inkubation mit Neuraminidase kann als selektiver Eingriff in die Membranstruktur bezeichnet werden. Weder Eigenschaften der Zellmembran wie osmotische Resistenz, Autohämolyserate bei 37°C oder Kaliumretention (40) sind gegenüber unbehandelten Erythrozyten verändert, noch Enzymaktivitäten innerhalb der Zelle, wie beispielsweise die der Glucose-6-phosphatdehydrogenase, der Hexokinase (83), der Pyruvatkinase oder der Cholinesterase (40). Der Spiegel an ATP (52, 83) wie die Membranverformbarkeit (32) erscheinen ebenfalls unverändert. Vermindert ist dagegen die elektrophoretische Mobilität, also die Oberflächenladung der Zellen (32). Ein Einfluß der negativen Ladung auf die Phagozytose von Zellen konnte für alte Erythrozyten jedoch ausgeschlossen werden (69).

4.5. Einfluß der Alterung in vivo

Wie schon in der Einleitung dargestellt, kann die Phagozytose von Erythrozyten nach Ausschluß von präparativen Schäden als

Kennzeichen einer ausreichend erkennbaren Alterung angesehen werden.

Dazu wurde in dieser Arbeit die Fraktion der dichtesten 10% der Erythrozyten benutzt. Bei der biochemischen Charakterisierung ergeben sich für diesen Anteil an den getrennten Zellen bereits deutlich erkennbare Unterschiede zu den Fraktionen der jüngeren Erythrozyten (23).

Bei der Perfusion einer Fraktion alter Erythrozyten, die 15% des getrennten Hämoglobins enthielt, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Fraktionen der reifen und jungen roten Blutzellen (siehe 3.7.4.2). Auch eine Verminderung dieser Fraktionsgröße auf etwa 13% (siehe 3.7.4.1) führte zwar zu einer vermehrten Sequestration jedoch zu keiner statistisch verwertbaren Abnahme. Dies zeigt, daß während der Ultrazentrifugation eine für die Phagozyten der Leber erkennbare Schädigung nicht auftrat. So wäre eine Verminderung des intrazellulären ATP denkbar gewesen, die zu nicht mehr kompensierbaren Membranveränderungen und damit zu einer verminderten Überlebenszeit hätte führen können (83).

Eine stark vermehrte Phagozytose alter Erythrozyten (9, 36, 60, 69) konnte mit dieser Versuchsdurchführung nicht gefunden werden. Der Vergleich mit den genannten Arbeiten fällt jedoch oft schwer, da zwischen den Laboratorien und den verschiedenen Trennmethode n nur selten vergleichbare Angaben über Größen und Eigenschaften verwendeter Fraktionen gemacht werden.

Die Streuung der Ergebnisse dieses Modells macht deutlich, daß eine Phagozytose von etwa 10% der eingesetzten Erythrozyten notwendig ist, um daraus signifikante Unterschiede errechnen zu können. Phagozytoseunterschiede von 50%, die sich als Zunahme phagozytierter Erythrozyten von 2 auf 3% erweisen (36), wären mit dem Modell der Leberperfusion auch bei weiterhin zu erwartenden Verbesserungen nur schwer nachzuvollziehen.

Die Verwendung von Fraktionen dagegen, die noch stärkere Anreicherungen alter Erythrozyten darstellen, erscheint durchaus sinnvoll. Bei einer Lebenserwartung der Rattenerythrozyten

von etwa 55 Tagen (97, 132) würden pro 24 Stunden 1/55, in zwei Stunden 1/660 der zirkulierenden Erythrozytenmenge abgebaut werden. Mit Fraktionsgrößen von 1 - 5 % könnten somit Anreicherungen alter Erythrozyten gewonnen werden, die auch beim hier vorgelegten Versuchsmodell zu signifikanten Unterschieden führen könnten.

Nimmt man die Immunglobulinbesetzung alter Erythrozyten als Kriterium für Erkennbarkeit durch Phagozyten, so müßten ebenfalls Fraktionen ältester Zellen verwendet werden. Es finden sich 99% der von roten Blutzellen ablösbaren IgG auf 3 - 5% der dichtesten Zellen (1).

Außerdem sollten neben alten und reifen Erythrozyten auch junge rote Blutzellen auf ihre Lebenserwartung hin untersucht werden. Neben Hinweisen auf eine verminderte Lebenserwartung eines Teils der jungen Erythrozyten (52) könnten dadurch die Hinweise auf Reifungsvorgänge von Retikulozyten und jungen Erythrozyten (6, 8, 9, 25) überprüft werden.

Auch für junge rote Blutzellen konnte bei den hier durchgeführten Perfusionsversuchen zwar ein Abfall des Hb_{ges} bezüglich reifer und alter Erythrozyten, jedoch kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Als mögliche Ursachen können Unreife und größere Vulnerabilität der jungen Zellen genannt werden. Auch hier erscheint eine Fraktionsverkleinerung zur Überprüfung der beobachteten Tendenz sinnvoll.

Während der Alterung des Erythrozyten finden eine Vielzahl von Veränderungen statt, die Cytoplasma wie Membran betreffen. Eine Auswahl davon soll im folgenden genannt werden.

Die Aktivitäten der intrazellulären Enzyme nehmen im allgemeinen ab. Dies betrifft unter anderen die Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G6PD) (8, 41, 44), die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) (43, 44, 78, 116), die Pyruvatkinase (PK) (41), die Cholinesterase (41, 125), die Glutathion-Reduktase (100) sowie die Superoxyd-Dismutase.

Eine Verminderung läßt sich ebenfalls für intrazelluläre Substrate, wie Adenosintriphosphat (ATP) (34, 118) nachweisen, wobei die intrazelluläre ATP-Konzentration (65) konstant zu bleiben scheint. Eine Abnahme wird auch für Kreatin (44, 78), Kalium (23) und 2,3-Diphosphoglycerat (23, 43) festgestellt.

Auch in der Membran findet eine Reihe von Veränderungen statt, so eine Abnahme von Cholesterin und Phospholipiden (23, 118) wobei ihr Verhältnis zueinander gleich bleibt (11, 23). Auch innerhalb der Gruppe der Phospholipide bleibt der prozentuale Anteil von Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Sphingomyelin (139) konstant. Neben dem abnehmenden Lipidgehalt der Zelle (118) vermindert sich jedoch auch das Lipidproteinverhältnis (118).

Auch die Kohlenhydrate der Zellmembran nehmen ab, wobei es innerhalb dieser Gruppe keine selektive Abnahme einzelner Verbindungen gibt (12, 18). Für das Kohlenhydrat-Proteinverhältnis wird ebenfalls eine Abnahme festgestellt (Zit.n.80, 18).

Die N-Acetylneuraminsäure (NANA) pro g Hämoglobin (23) wie pro Zelle (siehe 3.4.2.) nimmt ab. Pro Glycophorinmaßeinheit wird Konstanz (78) wie auch Abnahme festgestellt (99). Auf andere Kohlenhydrate der Membran bezogen, kann keine selektive Veränderung der NANA gefunden werden (18).

Dadurch wird die Wichtigkeit, beziehungsweise die Bedeutung der Bezugsgröße für die NANA-Messung verdeutlicht.

Die Membranproteine nehmen ebenfalls ab (23, jedoch 118).

Intrazelluläre Veränderungen, wie auch solche der Membran, bedingen eine Änderung physikalischer Eigenschaften wie die Abnahme der Deformierbarkeit der Erythrozyten (123), der Membranfluidität (11, 118), sowie der Viskosität des Cytoplasmas (137). Die Oberflächenladungsdichte bleibt konstant (116, jedoch 33).

Dies deutet darauf hin, daß zumindest partiell die Veränderungen auf einen Verlust von Teilen der Membran zurückzuführen sind (43, 78). Die beobachtete Verringerung des zellulären Volumens (MCV) sowie, bei gleichbleibendem Gehalt an Hämoglobin (MCH), das Ansteigen der Hämoglobinkonzentration sowie der Dichte des Erythrozyten kann aus dem Membranverlust hergeleitet werden. Eine umfassende Erklärung dieser Vorgänge sowie deren Bedeutung für die Elimination durch das RES existiert zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht.

Auch der Eliminationsmechanismus der gealterten roten Blutzellen durch das reticuloendotheliale System erscheint noch unklar.

Von einer Reihe von Hypothesen wird den Phagozyten die passive Rolle des Entferns zerstörter oder stark veränderter Zellen zugeteilt (134, 135). Ihre Fähigkeit dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden (siehe 4.6.1.) Demgegenüber stehen Vermutungen, daß die Elimination durch Vermittlung von Serumopsoninen erfolgen könnte.

So fand man beispielsweise ausschließlich auf alten Zellen Immunglobuline vom Typ IgG, denen die Rolle von "physiologischen Autoantikörpern" gegen alte Zellen zugesprochen wurde (1,2,60,62,79,80). Die Bindung dieses Antikörpers erfolgt mit seinem Fab-Teil auf dem Erythrozyten (17), während der Fc-Teil vom entsprechenden Rezeptor der Phagozytenmembran gebunden wird. Dieser "physiologische Autoantikörper" bindet sich auch an neuraminidasebehandelte und in vitro gelagerte Erythrozyten (62), jedoch nicht an junge Zellen (60, 62). An in vivo gealterten Erythrozyten scheinen sie nur an den dichtesten (ältesten) Erythrozyten (3-5%) gebunden zu sein (1) und ab einer Mindestmenge von etwa 100 pro Zelle die Phagozytose auszulösen (60).

Es wird vermutet, daß es sich bei dem Antigen um ein Protein oder Sialoglykoprotein handelt, wahrscheinlich jedoch nicht um das Glycophorin (2, 63, 79).

Da der reife Erythrozyt die Fähigkeit zur Proteinbiosynthese verloren hat, wird weiterhin angenommen, daß auch junge Zellen bereits diese Struktur besitzen, sie jedoch für Immunglobuline noch nicht erkennbar vorliegt. Als mögliche Membranveränderungen werden Dimerisierung monovalenter Antigene (80) sowie Freilegen von Kryptantigenen, beispielsweise durch Abspaltung von NANA mit Exposition des darunterliegenden Galaktosylrestes (2), genannt.

Geht man von dieser Hypothese aus, so ist eine Inkubation alter Erythrozyten vor der Perfusion in Plasma oder einer diesen "physiologischen Autoantikörper" enthaltenden Lösung nicht mehr nötig. Das an Erythrozyten angelagerte Immunglobulin läßt sich durch die benutzten Verfahren der Ultrazentrifugation, ja nicht einmal bei der Präparation von Membranen entfernen (60, 62).

4.6. Alterierung in vitro - ein Modell der in vivo Alterung von Erythrozyten?

4.6.1. Fixation mit Glutaraldehyd, hypotone Hämolyse

Bei alten Erythrozyten kann eine Zunahme der Rigidität der Membran beobachtet werden (11, 118), was allerdings nicht unwidersprochen geblieben ist (93).

Dies wird einerseits auf Konformationsänderungen der Zellmembran besonders innerhalb der Membranproteine zurückgeführt, oder auch auf veränderte Interaktionen zwischen Membranlipiden und Membranproteinen (11).

Andererseits scheint die Viskosität des Cytoplasmas der roten Blutzellen mit dem Alter zuzunehmen (137). Auch scheint der Abfall an intrazellulärem ATP mit einer Verminderung der Deformierbarkeit des Erythrozyten einherzugehen (123).

Dies führte zur Vermutung, daß alte Erythrozyten in den Sinus der Milz hängen bleiben. Durch Hypoxie Glucose- und ATP-Verminderung, aber auch durch mechanische Einwirkungen, die zu Fragmentation und Abscherungen führen können, würde schließlich die Zerstörung der Zelle eintreten. Die Makrophagen hätten dann die Aufgabe, diese Zellen aus der Zirkulation zu eliminieren (134, 135).

In vitro kann eine Erhöhung der Steifheit der Erythrozytenmembran durch Fixation mit Glutaraldehyd herbeigeführt werden (45). Die Resistenz so behandelter Zellen gegenüber Scherkräften auf die Membran beträgt ein 50-100faches des Wertes unbehandelter Erythrozyten, während in vivo gealterte Blutzellen nur ein zweifaches davon erreichen (50).

Bei den durchgeführten Perfusionen glutaraldehydfixierter Erythrozyten (siehe 3.7.3.2) wurde eine schnelle Entfernung der Zellen aus dem Perfusionsmedium beobachtet. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte dies auf Phagozytose durch von Kupffer'sche Sternzellen zurückgeführt werden. Dies weist darauf hin, daß eine erhöhte Membranrigidität für ein Entfernen alter Erythrozyten aus der Zirkulation verantwortlich sein könnte.

Ob dies auch in vivo eine Rolle spielt, ist bestritten worden (45).

Die Abnahme einer ganzen Reihe von Enzymaktivitäten im Laufe der Erythrozytenalterung (siehe 4.5.) könnte ebenfalls einen maßgeblichen Einfluß auf die Elimination haben (100). Bedeutung kommt dabei vor allem den energiegewinnenden Reaktionen zu, im besonderen den Enzymen Glycerin-3-phosphatdehydrogenase, Glucose-6-phosphatdehydrogenase und Hexokinase (97). Bei in vivo gealterten Erythrozyten wird tatsächlich ein verminderter ATP-Gehalt gefunden (23, 43, 118), es wurde jedoch auch Konstanz der ATP-Konzentration festgestellt (65). Ein Versagen der Energiegewinnung hätte letztendlich auch einen Stillstand der Na-K-Pumpe zur Folge, damit eine Zerstörung der Zelle.

Durch eine andere Veränderung in vitro, die hypotone Hämolyse, kann ebenfalls eine Unterbrechung der Energiegewinnung im Zellinneren erreicht werden. Die so geschaffene Membrandiskontinuität schließt sich wieder, sodaß Korpuskel mit etwas erhöhtem Volumen entstehen (66).

So veränderte rote Blutzellen wurden in isotoner Perfusionslösung bei Serie III eingesetzt (siehe 3.7.3.1). Es kam zu einer schnellen Verminderung der Ausgangszellzahl, womit auch dieser Vorgang bei der Elimination alter Erythrozyten in Frage käme.

Eine weitere Möglichkeit der Verminderung des intraerythrozytären ATP-Gehalts kann durch Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ in glucosefreier Salzlösung erreicht werden (60, 62, 69, 83). Dabei läßt sich ein Auftreten von Membranvesikeln im Überstand beobachten (43, 77). Verminderter ATP-Gehalt führt also zu Vesikelabschnürungen aus der Zellmembran und ähnelt damit der von WEED (134, 135) beschriebenen Fragmentation.

Nach der Inkubation mit glucosefreien Medien weisen die roten Blutzellen eine Verringerung des Membran-NANA-Gehalts auf (83), die sich auch bei alten Erythrozyten feststellen läßt. Die Injektion ATP-verarmter roter Blutzellen in das Spender-tier ergibt eine verkürzte Lebenserwartung dieser Zellen (83). Dies stellt einen möglichen Erklärungsweg dar, der intrazelluläre Veränderungen mit Modifikationen der Membran verbindet.

Gleichzeitig ergeben sich daraus zwei weitere Möglichkeiten

zur Alterung in vitro: Verminderung des intrazellulären ATP-Gehalts durch Lagerung und selektive Entfernung membranständiger NANA. Letzteres wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht.

4.6.2. Abspaltung von N-Acetylneuraminsäure (NANA)

Ein in Glykoproteinen und Glykolipiden häufig vorkommendes substituiertes Monosaccharid ist die Sialinsäure (47, 56). Unter dieser Bezeichnung werden N- beziehungsweise O-substituierte Neuraminsäuren zusammengefaßt (47, 56). Sie wurden von KLENK (67) aus Abbauprodukten von Gangliosiden isoliert. Am häufigsten kommt darunter die N-Acetylneuraminsäure (NANA) vor, eine am Stickstoffatom acetylierte Neuraminsäure. In Glykoproteinen sitzt sie in endständiger Stellung des Kohlenhydratanteils, oft mit Galaktose als nachfolgendem Monosaccharid (70, 87).

Diese Bindung der NANA an Oligo- oder Monosaccharide ist alphan glykosidisch. Sie läßt sich durch Säure sowie durch Neuraminidase spalten (56). Von beiden Möglichkeiten wurde in dieser Arbeit Gebrauch gemacht.

Der hydrophile Kohlenhydratanteil der membranständigen Glykoproteine ist auf der Außenseite der Zellmembran lokalisiert (70, 87). Wegen der negativen Ladung ihrer Carboxylgruppe unter physiologischen pH-Werten zeichnet die NANA deshalb auch für die negative Oberflächenladung der Erythrozyten verantwortlich (33).

Sie tragen jedoch auch zu weiteren Eigenschaften der Zellmembran bei. So fanden ASHWELL und MORELL (88), daß Plasmaglykoproteine von Hepatozyten aus der Zirkulation entfernt werden, wenn ihre endständige NANA abgetrennt wird.

Da auch auf alten Erythrozyten der Gehalt an NANA vermindert ist (siehe 4.4.), wurde versucht, die Erfahrung mit Glykoproteinen des Plasmas auf die Glykoproteine der Zellmembran zu übertragen (6, 58, 96).

Abhängig von der Menge an abgespalteter NANA (6, 41, 94) findet sich auch tatsächlich eine Verkürzung der Lebensdauer so behandelter roter Blutzellen nach Injektion in den intakten Spenderorganismus (6, 32, 40, 41, 42, 58).

Als Abbauort für diese desialysierten Erythrozyten werden Leber und Milz angesehen (8, 58). Als verantwortliche Zellen übernehmen in der Leber die von Kupffer'schen Sternzellen diese Aufgabe, nicht jedoch die Hepatozyten (4, 58).

Ob die beobachtete Adhärenz desialysierter Erythrozyten an Rezeptoren für Galaktosylreste an Hepatozyten (71) und von Kupffer'sche Sternzellen auch für die Vorgänge in vivo Bedeutung besitzt, (92) muß noch offen bleiben.

Die Abspaltung von mehr als 50% der NANA führt zu einer besonders drastischen Verkürzung der Überlebenszeit im Organismus (16, 27). Bei den hier benutzten Erythrozyten für die Serien VIII und IX wurden 90% der säurehydrolytisch abspaltbaren NANA mittels Neuraminidase entfernt. Bei den damit durchgeführten Perfusionen ließ sich eine Verminderung der eingesetzten Hämoglobinkonzentration um 20% beobachten (siehe VIII, 3.7.3.3)

Bei Versuchen mit isolierten Leber- und Milzzellen (4) sowie bei Verwendung von Lebergewebsschnitten (58) lassen sich Adhärenz oder Adsorption feststellen. Ein Versuchsmodell mit Monozytenkulturen ergab auch Phagozytose.

Dem gegenüber stehen Ergebnisse mit Makrophagenkulturen, bei denen Phagozytose neuraminidasebehandelter Erythrozyten nur nach Inkubation mit Immunglobulinen der Klasse G (nicht jedoch der Klassen A und M) (60, 62, 95) stattfinden konnte. Der Grad der Adhärenz blieb dabei unberücksichtigt (62). Um einen Einfluß von Immunglobulinen zu testen, wurde in dieser Arbeit in der Versuchsserie IX unmittelbar vor dem Experiment eine Inkubation desialysierter Erythrozyten in Plasma vorgenommen. Mit einer Verminderung um 24% der Ausgangshämoglobinkonzentration kam es dabei jedoch zu keiner höheren Phagozytoserate (siehe IX, 3.7.3.3).

Wegen der hier nicht näher vorgenommenen Unterscheidung zwischen Phagozytose und Adhärenz (siehe 4.2.1.) kann nichts über die Qualität des jeweiligen Hb_{ges}-Abfalls ausgesagt werden. So kann durchaus nach Plasmainkubation bei gleicher Sequestationsrate der Grad der Phagozytose erhöht sein.

Bei der Plasmainkubation wird erythrozytenautologes und makrophagenhomologes Plasma verwendet. AMINOFF (4) beobachtet

Rosettenbildung bei homologen wie autologen Systemen, CELADA (22) findet auch quantitativ keinen Unterschied.

Dadurch stellt sich die Frage nach der Interaktion zwischen neuraminidaseinkubierten Erythrozyten und Makrophagen. Folgende Hypothesen wurden dabei aufgestellt:

- a) Spezifische Erkennung, jedoch ohne Vermittlung von Serumopsoninen (4);
- b) Spezifische Erkennung durch Faktoren auf Makrophagen, die durch Trypsin entfernt werden können, jedoch durch Seruminkubation wieder ersetzt werden (126);
- c) Spezifische Erkennung durch Vermittlung von Immunglobulinen der Klasse G, die sich mit ihrem Fab-Teil auf desialysierten Erythrozyten anlagern. Ihr Fc-Teil kann von den Makrophagen gebunden werden (60, 62). Ebenso kann Komplement auf desialysierten roten Blutzellen angelagert werden (60).

Desialysierung führt auch zur Exposition einer Bindungsstelle für T-Agglutinin (120), das aber als Opsonin kaum in Frage kommt (94).

Eine Verminderung der Oberflächenladung der roten Blutzelle scheint ebenfalls kein ausreichender Grund für eine gesteigerte Phagozytose zu sein (69).

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß für die Sequestration desialysierter roter Blutzellen ein direktes Erkennen durch die von Kupffer'schen Sternzellen möglich ist.

Die Beobachtung einer verkürzten Lebenszeit läßt sich ebenfalls nachvollziehen. Von daher scheint ein Altern durch Abspaltung von NANA möglich. Die Ergebnisse anderer Arbeiten lassen daran jedoch Zweifel aufkommen.

Dazu gehören die bereits aufgeführten Beobachtungen, wonach bei der Zellalterung keine selektive Abspaltung einzelner Kohlenhydrate der Zellmembran stattfindet (18) und auch die Oberflächenladungsdichte nicht abnimmt (116). Da für die Phagozytose alter Erythrozyten bereits eine Anzahl von 100 Immunglobulinen ausreichen soll (60), könnten bereits kaum meßbare, kleine Änderungen der Membran-NANA eine Phagozytose auslösen.

Die eingangs erwähnte selektive Abspaltung von 50% der NANA kann in vivo jedoch ausgeschlossen werden.

Desialysierte Erythrozyten vermögen, im Gegensatz zu in vivo gealterten Blutzellen, nicht Erdnuß-Agglutinin zu binden (120). Sie absorbieren aber den von KAY postulierten "physiologischen Autoantikörper" (62) ebenso wie dies alte Erythrozyten tun.

GATTEGNO (41) findet, daß junge desialysierte rote Blutzellen eine längere Überlebenszeit im Organismus aufweisen als nicht behandelte alte Zellen mit einem ähnlichen NANA-Gehalt.

BALDUINI (6, 8) stellt nach Inkubation mit Neuraminidase und Injektion in den Spenderorganismus einen Abfall alter wie junger Erythrozyten fest. Ein Teil der jungen roten Blutzellen erscheint jedoch wieder in der Zirkulation. Der Autor folgert daraus, daß der Gehalt an NANA der Membran nicht der einzige, die Lebenszeit roter Blutzellen determinierende Faktor sein kann.

5. Zusammenfassung

1. Aufgrund der Erfahrungen mit der isolierten Rattenleber wurde in der vorliegenden Arbeit ein Versuchsmodell zur Perfusion von Erythrozyten entwickelt. Anhand einer Reihe von biochemischen Parametern wurde ein annähernd physiologisches Stoffwechselverhalten über 120 Minuten hinweg nachgewiesen.
2. Als Maß der Sequestration von Erythrozyten diente der Abfall der Gesamthämoglobinkonzentration im Perfusat. Freies Hämoglobin wurde von der Rattenleber nicht aufgenommen.
3. Heterologe Erythrozyten wurden erkannt und in der Leber sequestriert. Autologe rote Blutzellen nahmen nur geringfügig ab, jedoch stärker als homologe Erythrozyten. Für die weiteren Perfusionsversuche wurden deshalb homologe Rattenerythrozyten verwendet.
4. Die Trennung roter Blutzellen gemäß ihres Alters erfolgte mit zwei Varianten der Dichte zentrifugation. Die so gewonnenen Fraktionen junger, reifer und alter Erythrozyten wurden quantitativ erfaßt und anhand von hämatologischen Parametern charakterisiert. Mit zunehmendem Lebensalter verringerte sich das mittlere zelluläre Volumen. Während die mittlere Menge an Hämoglobin konstant blieb, stieg die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration an.
5. Ein drittes Verfahren, die Trennung mit einem Elutriationsrotor, wurde vorgestellt.
6. Der durch Säurehydrolyse abspaltbare Neuraminsäuregehalt von Rattenerythrozyten wurde mittels der Thiobarbitursäuremethode bestimmt. Er betrug bei Rattenerythrozyten $5,52 \pm 1,26$ $\mu\text{g/RBC}$. Ebenso wurden bei den zwei Verfahren zur Dichtentrennung der NANA-Gehalt der Erythrozyten bei jungen, reifen und alten Zellen bestimmt. Verglichen mit der reifen Zellpopulation ergab sich eine verminderte Menge bei alten sowie ein geringerer Gehalt bei jungen Erythrozyten.
7. Mit dem Enzym Neuraminidase ließen sich 90% der säurehydrolytisch abtrennbaren NANA entfernen.

8. Mittels zweier Verfahren wurden 3 Fraktionen in vivo gealterter Erythrozyten gewonnen und perfundiert. Besonders bei der Trennung mittels Dichte zentrifugation zeigte sich eine höhere Sequestrationsrate alter verglichen mit reifen Zellen. Unreife/junge Erythrozyten wurden ebenfalls, allerdings nicht signifikant, besser phagozytiert als die reife Fraktion.

9. Die Alterung von Erythrozyten wurde in vitro mittels dreier Verfahren simuliert. Die Fixation mit Glutaraldehyd imitierte die herabgesetzte Deformierbarkeit alter Zellen. Die hypotone Hämolyse stellte den Zusammenbruch intrazellulärer Energiegewinnungsprozesse nach.

Die selektive Abspaltung von etwa 90% der membrangebundenen NANA simulierte eine Eigenschaft der Zellmembran wie sie bei alten Zellen in geringerem Ausmaß (15 - 25%) auch in dieser Arbeit beobachtet wurde.

Alle drei Methoden zogen eine signifikante Abnahme der Hämoglobinkonzentration im Perfusat nach sich und unterstrichen so die Möglichkeit aller drei Mechanismen bei der altersabhängigen Erythrozytenphagozytose.

Die Leberperfusion beantwortet dabei allerdings nur die Frage, ob die vorgenommenen Veränderungen von den abbauenden Zellen des RES erkannt werden können. Offen bleibt dabei, ob es sich wirklich um eine gute Annäherung an Vorgänge der Alterung in vivo handelt oder ob nur die Auswirkungen einer Schädigung beobachtet wurden. Diese Frage wurde besonders für das Verfahren der NANA-Abspaltung diskutiert.

Die Abspaltung von NANA alleine scheint eine umfassende Annäherung an die in vivo-Alterung nicht zu gewährleisten, da es nicht zu einer drastischen Phagozytose der NANA-ase behandelten Zellen kommt. Das gleiche gilt für die Fixation mit Glutaraldehyd wie auch für die hypotone Hämolyse, da die Phagozytose der Erythrozyten durch eine zu krasse Schädigung ausgelöst wird.

10. Die hier beobachtete Sequestration von Erythrozyten war ohne Serumopsonine möglich. Eine vorherige Inkubation mit autologem Plasma führte nicht zu einer vermehrten Sequestration neuraminidasebehandelter Erythrozyten durch die von Kupffer'schen Sternzellen der Rattenleber.

11. Die "unspezifische" Sequestration von Erythrozyten folgte der Exponentialfunktion $C(t) = C_0 \times e^{-kt}$.

6. Literatur

1. ALDERMAN, E.M., H.H. FUDENBERG, R.E. LOVINS
Binding of immunoglobulin classes to subpopulations of human red blood cells separated by density-gradient centrifugation
Blood 55 (1980) 817 - 821
2. ALDERMAN, F.M., H.H. FUDENBERG, R.E. LOVINS
Isolation and characterization of an age-related antigen present on senescent human red blood cells
Blood 58 (1981) 341 - 349
3. AMINOFF, D.
Methods of the quantitative estimation of N-Acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids
Biochem. J. 81 (1961) 384 - 392
4. AMINOFF, D., W.F. VORDER BRUEGGE, W.C. BELL, K. SARPOLIS, R. WILLIAMS
Role of sialic acid in survival of erythrocytes in the circulation: Interaction of neuraminidase-treated and untreated erythrocytes with spleen and liver at the cellular level
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 1521 - 1524
5. ASCHOFF, L.
Das reticulo-endotheliale System
Ergebn. Inn. Med. Kinderheilk. 26 (1924) 1 - 118
6. BALDUINI, C.L., G. RICEVUTI, M.C. SOSSO, E. ASCARI, A. BROVELLI, C. BALDUINI
In vivo behaviour of neuraminidase-treated rabbit erythrocytes and reticulocytes
Acta Haemat. 57 (1977) 178 - 187
7. BALDUINI, C.L., G. RICEVUTI, M. SOSSO, E. ASCARI, C. BALDUINI
Membrane sialic acid and behaviour in vivo of rabbit "stress" macroreticulocytes
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358 (1977) 1143 - 1148

8. BALDUINI, C.L., F. SINIGAGLIA, E. ASCARI, C. BALDUINI
Behaviour of young and old desialylated rabbit erythrocytes in vivo
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359 (1978) 1573 - 1577
9. BALDUINI, C., A. BROVELLI, G. PALLAVICINI, F. SINIGAGLIA, C.L. BALDUINI, G. AIROLDI
Reversible and irreversible structural modifications of erythrocyte membrane
Acta Biol. Med. Germ. 40 (1981) 401 - 408
10. BALLENTINE, R., D.D. BURFORD
Differential density separation of cellular suspensions
Analytical Biochemistry 1 (1960) 263 - 268
11. BARTOSZ, G.
Aging of the erythrocyte IV. Spin-label studies of membrane lipids, proteins and permeability
Biochim. Biophys. Acta 664 (1981) 69 - 73
12. BAXTER, A., J.G. BEELEY
Surface carbohydrates of aged erythrocytes
Biochem. Biophys. Res. Commun. 83 (1978) 466 - 471
13. BENONIEL, A.M., C. CAPO, P. BONGRAND, A. RYTER
Non-specific binding by macrophages: Existence of different adhesive mechanisms and modulation by metabolic inhibitors
Immunology 41 (1980) 547 - 560
14. BERGHIM, L., I. AHIGREN, G. LAHNBORG
Heparin-induced impairment of phagocytic and catabolic functions of the reticuloendothelial system in rats
In: E. Wisse, D.L. Knooks eds, Kupffer cells and other liver sinusoidal cells
Elsevier, Amsterdam (1977) 379 - 385
15. BERGMAYER, H.U. (Hrsg.)
Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1970) 134, 137, 1409, 1773, 1777, 1093

16. BIOZZI, G., C. STIFFEL
The physiopathology of the reticuloendothelial cells
of the liver and spleen
In: Progress in liver diseases, ed. by H. Popper and
F. Schaffner, Heinemann, London (1965) 166 - 191
17. BISSELL, D.M., L. HAMMAKER, R. SCHMID
Hemoqlobin and erythrocyte catabolism in rat liver:
The separate roles of parenchymal and sinusoidal cells
Blood 40 (1972) 812 - 822
18. BLADIER, D., L. GATTEGNO, F. FABIA, G. PERRET,
P. CORNILLOT
Individual variations of the seven carbohydrate components
of human erythrocyte membrane during aging in vivo
Carbohydr. Res. 83 (1980) 371 - 376
19. BORUM, F.R., W.G. FIGUEROA, S.M. PERRY
The distribution of ⁵⁹-tagged human erythrocytes in cen-
trifuged specimen as a function of cell age
J. Clin. Invest. 36 (1957) 676 - 679
20. BRÖMME, H.J., W. BLEICH
Charakterisierung des funktionalen Zustandes der in
vitro Hb-frei perfundierten Rattenleber
Acta Biol. Med. Germ. 40 (1981) 1009 - 1020
21. BÜCHER, T.
"Physiologie"
In: 121, 11
22. CELADA, A.
In vitro phagocytosis and catabolism of opsonized erythro-
cytes by human monocytes
Allergol. et Immunopathol. 9 (1981) 539 - 544
23. COHEN, N.S., J.E. EKHOLM, M.G. LUTHRA, D.J. HANAHAN
Biochemical characterization of density-separated human
erythrocytes
Biochim. Biophys. Acta 419 (1976) 229 - 242

24. COLLINS, F.G., J.I. SKIBBA
Improved in situ rat liver perfusion technique
J. Surg. Res. 28 (1980) 65 - 70
25. COME, S.E., S.B. SHOHET, S.H. ROBINSON
Surface remodeling vs. whole-cell hemolysis of reticulo-
cytes with erythroid stimulation or iron deficiency
anemia
Blood 44 (1974) 817 - 830
26. CROFTON, R.W., M.M.C. DIESELHOFF-den DULK,
R. van FURTH
The origin, kinetics, and characteristics of the Kupffer
cells in the normal steady state
J. Exp. Med. 22 (1978) 1 - 17
27. CZOP, J.K., D.T. FEARON, K.F. AUSTEN
Membrane sialic acid on target particles modulates their
phagocytosis by a trypsin-sensitive mechanism on human
monocytes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 3831 - 3835
28. DANON, D., Y. MARIKOVSKY
Determination of density distribution of red cell popu-
lation
J. Lab. Clin. Med. 64 (1964) 668 - 674
29. DANON, D., Y. MARIKOVSKY, A. FUREDI, I. OHAD
On the separation of old from young erythrocytes in hypo-
tonic bovine albumin solutions
Biochim. Biophys. Acta 104 (1965) 281 - 284
30. DODGE, J.T., C. MITCHELL, D.J. HANAHAN
The preparation and chemical characteristics of hemo-
globin-free ghosts of human erythrocytes
Arch. Biochem. Biophys. 100 (1963) 119 - 130
31. D'SILVA, J.L., M.W. NEIL
The potassium, water and glycogen contents of the per-
fused rat liver
J. Physiol. 124 (1954) 515 - 527

32. DUROCHER, J.R., R.C. PAYNE, M.F. CONRAD
Role of sialic acid in erythrocyte survival
Blood 45 (1975) 11 - 20
33. EYLAR, E.H., M.A. MADOFF, O.V. BRODY, J.L. ONCLEY
The contribution of sialic acid to the surface charge of
the erythrocyte
J. Biol. Chem. 237 (1962) 1992 - 2000
34. FABIA, F., L. GATTEGNO, J.C. GLUCKMAN, P. CORNILLOT
Effects of ageing, surface sialic acid and glycopeptides
of erythrocytes on auto-rosettes in man
Clin. Exp. Immunol. 34 (1978) 295 - 301
35. FAIRBANKS, G., T.L. STECK, D.F.H. WALLACH
Electrophoretic analysis of the major polypeptides of
the human erythrocyte membrane
Biochemistry 10 (1971) 2606 - 2617
36. FRANCO, M., F.J. NORDT, A.P. CORFIELD, R. SCHAUER
Sialidase treatment of rat-erythrocytes: A model for
cellular ageing?
Acta Biol. Med. Germ. 40 (1981) 409 - 412
37. FURTH, R. van
The mononuclear phagocyte system: A new classification
of macrophages, monocytes, and their precursor cells
Bull. World Health Organ. 46 (1972) 845 - 852
38. FURTH, R. van, J.A. RAEBURN, T.L. v. ZWET
Characteristics of human mononuclear phagocytes
Blood 54 (1979) 485 - 500
39. GALT, R.P., R.S. SPARKES, D.W. GOLDE
Bone marrow origin of hepatic macrophages (Kupffer cells)
in humans
Science 201 (1978) 937 - 938
40. GATTEGNO, L., D. BLADIER, P. CORNILLOT
The role of sialic acid in the determination of survival
of rabbit erythrocytes in the circulation
Carbohydr. Res. 34 (1974) 361 - 369

41. GATTEGNO, L., D. BLADIER, P. CORNILLLOT
Ageing in vivo and neuraminidase treatment of rabbit erythrocytes: Influence on half-life as assessed by ^{51}Cr labelling
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356 (1975) 391 - 397
42. GATTIGNO, L., F. FABIA, D. BLADIER, P. CORNILLLOT
Physiological ageing of red blood cells and changes in membrane carbohydrates
Biomedicine 30 (1979) 194 - 199
43. GREENWALT, T.J., E.A. STFANE, F.O. LAU, K. SWEENEY-HAMMOND
Aging of the human erythrocyte
In: Immunobiology of the erythrocyte, ed. by A.R. Liss, New York (1980) 195 - 212
44. GROSS, K., S.M. RAPOPORT, S. ROSENTHAL, I. SYLIM-RAPOPORT
Criteria of maturity and age of red blood cells
Acta. Biol. Med. Germ. 40 (1981) 665 - 668
45. HAEST, C.W.M., G.K. DRIFFSEN, D. KAMP, H. HEIDTMANN, T.M. FISCHER, M. STÖHR-LIESEN
Is "deformability" a parameter for rate of elimination of erythrocytes from the circulation ?
Pflügers Arch. 388 (1980) 69 - 73
46. HALPERN, B.N.
The role and function of the reticulo-endothelial system in immunological processes
J. Pharm. Pharmacol. 11 (1959) 321 - 338
47. HARPER, H.A., G. LÖFFLER, P.E. PETRIDES, L. WEISS
Physiologische Chemie
Springer Verlag, Berlin 1975
48. HEGNER, D., D. PLATT, H. HECKERS, U. SCHLOEDER, V. BRÜNINGER
Age-dependent physicochemical and biochemical studies of human red cell membranes
Mech. Age. Dev. 10 (1979) 117 - 130

49. HEMS, R., B.D. ROSS, M.N. BERRY, H.A. KREBS
Gluconeogenesis in the perfused rat liver
Biochem. J. 101 (1966) 284 - 292
50. HFUSINKVELD, R.S., D.A. GOLDSTEIN, R.I. WEED, P. LACELLE
Effect of protein modification on erythrocyte membrane
mechanical properties
Blood Cells 3 (1977) 175 - 182
51. HÖLLER, M., H. BREUER
Eine optimale Methode zur hämoglobinfreien Perfusion der
isolierten Rattenleber
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12 (1974) 398 - 402
52. HOFMANN, L.-H., Th. VÖMEL
Radioisotopen-Untersuchungen mit ^{59}Fe und ^{51}Cr zur Frage
der Lebensdauer von Kaninchen-Erythrozyten
Inaugural-Dissertation, Gießen 1978
53. HOHORST, H.-J.
L-(+)-Lactat. Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und NAD
In: 15
54. HOPF, U., G. RAMADORT
Physiologie und Pathophysiologie des retikuloendothelia-
len Systems der Leber
Leber Magen Darm 10 (1980) 277 - 283
55. HUBER, H., S.D. DOUGLAS, H.H. FUDENBERG
The IgG receptor: An immunological marker for the charac-
terisation of mononuclear cells
Immunology 17 (1969) 7 - 21
56. JÄCKH, R.
Chemie und Biologie der Sialinsäuren
Chemie in unserer Zeit 5 (1976) 139 - 146
57. JAFFE, C.J., J.M. VIERLING, E.A. JONES, T.J. LAWLEY,
M.M. FRANK
Receptor specific clearance by the reticuloendothelial
system in chronic liver diseases
J. Clin. Invest. 62 (1978) 1069 - 1077

58. JANCIK, J.M., R. SCHAUER
Sequestration of neuraminidase-treated erythrocytes
Cell. Tiss. Res. 186 (1978) 209 - 226
59. JAROSLOW, B.N., J.W. LARRICK
Clearance of foreign red cells from the blood of aging mice
Mech. Age. Dev. 2 (1973) 23 - 32
60. KAY, M.M.B.
Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 (1975) 3521 - 3525
61. KAY, N.E., S.D. DOUGLAS
Mononuclear phagocyte. Development, structure, function, and involvement in immune response
N.Y.St. J. Med. (1977) 327 - 339
62. KAY, M.M.B.
Role of physiologic autoantibody in the removal of senescent human red cells
J. Supramolec. Struct. 9 (1978) 555 - 567
63. KAY, M.M.B.
The IgG autoantibody binding determinant appearing on senescent membranes resides on a 62000 MW peptide
Acta Biol. Med. Germ. 40 (1981) 385 - 391
64. KISSLER, M., R. SCHUBOTZ
Die O₂-Versorgung der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber
In: 121. 12 - 24
65. KIRKPATRICK, F.H., A.G. MUHS, R.K. KOSTUK, C.W. GABEL
Dense (aged) circulating red cells contain normal concentrations of adenosine triphosphate (ATP)
Blood 54 (1979) 946 - 950
66. KINO, KOHSUKE, H. TSUNOO, Y. HIGA, M. TAKAMI, H. HAMAGUCHI, H. NAKAJIMA
Hemoglobin-haptoglobin receptor in rat liver plasma membrane
J. Biol. Chem. 255 (1980) 9616 - 9620

67. KLENK, E.
Neuraminic acid
In: The chemistry and biology of mucopolysaccharides,
ed. by G.E.W. Wolstenholme and M.O'Connor, J. and
A. Churchill, London 1958, 296 - 311
68. KNOOK, D.L., E.C. SIEYSTER
Separation of Kupffer and endothelial cells of the rat
liver by centrifugal elutriation
Exp. Cell Res. 99 (1976) 444 - 449
69. KNYSZYNSKI, A., S.J. LEIBOVICH, E. SKUTELSKY, D. DANON
Macrophages from unstimulated, mineral oil and thiogly-
collate-stimulated mice: A comparative study of surface
anionic sites and phagocytosis of "old" red blood cells
J. Reticuloend. Soc. 24 (1978) 205 - 215
70. KÖTTIGEN, E., Ch. BAUER, W. REUTER, W. GEROK
Neue Ergebnisse zur biologischen und medizinischen
Bedeutung von Glycoproteinen
Klin. Wochenschr. 57 (1979) 151 - 159, 199 - 214
71. KOLB, H., C. SCHUDT, V. KOLB-BACHOFFEN, H.-A. KOLB
Cellular recognition by rat liver cells of neuraminidase-
treated erythrocytes
Exp. Cell Res. 113 (1978) 319 - 325
72. KREBS, H.A.
Formation of ketone bodies in the perfused rat liver
In: 121, 129 - 141
73. KREBS, H.A., K. HENSELEIT
Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 210 (1932) 33 - 66
74. KRONE, W., W.B. HUTTNER, S.C. KAMPF, B. RITTICH,
H.J. SEITZ, W. TARNOWSKI
Long-term perfusion of the isolated rat liver. Main-
tenance of its functional state by use of a fluorocarbon
emulsion
Biochim. Biophys. Acta 372 (1974) 55 - 71

75. LEIBOVICH, S.J., A.KNYSZYNSKI
In vitro recognition of "old" red blood cells by macrophages from syngeneic mice: Characteristics of the macrophage-red blood cell interaction
J. Reticuloend. Soc. 27 (1980) 411 - 419
76. LINDNER, A.
Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure, Birkhäuser, Basel ⁴1964
77. LUTZ, H.U., S.CHAUI, J.PALEK
Release of spectrin-free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion
J. Cell. Biol. 73 (1977) 548 - 560
78. LUTZ, H.U., J.FEHR
Total sialic acid content of glycophorins during senescence of human red blood cells
J. Biol. Chem. 254 (1979) 11177 - 11180
79. LUTZ, H.U., M.M.B. KAY
An age-specific cell antigen is present on senescent human red blood cell membranes. A brief note
Mech. Age. Dev. 15 (1981) 65 - 75
80. LUTZ, H.U.
Elimination alter Erythrozyten aus der Zirkulation: Freilegung eines zellalter-spezifischen Antigens auf alten Erythrozyten
Schweiz. med. Wschr. 111 (1981) 1507 - 1517
81. MANDACHE, E., E.MOLDOVEANU
The Kupffer cells. Ultrastructural and functional features
Morphol. Embryol. (Bucur.) 25 (1979) 291 - 300
82. MARCHESI, V.L., L.W.HILLACK, R.L.JACKSON, J.P.SEGREST, R.L.SCOTT
Chemical characterization and surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1972) 1445 - 1449

83. MARIKOVSKY, Y., E. ELAZAR, D. DANON
Rabbit erythrocyte survival following diminished sialic acid and ATP depletion
Mech. Age. Dev. 6 (1977) 233 - 240
84. MARTIN, M., C. TEJERO, M. GALVEZ, M. PINILLA, J. LUQUE
Separation by counter-current distribution of rat and chicken erythrocytes of different age, and its application to the assay of enzyme activities
Acta Biol. Med. Germ. 40 (1981) 979 - 984
85. MELLANBY, J., H. WILLIAMSON
Acetoacetat
In: 15, 1776 - 1779
86. MICHL, J.
Receptor mediated endocytosis
Am. J. Clin. Nutr. 33 (1980) 2462 - 2471
87. MILLER, L.L., C.G. BLY, M.L. WATSON, W.F. BALE
The dominant role of the liver in plasma protein synthesis
J. exp. Med. 94 (1951) 431 - 453
88. MORELL, A.G., G. GREGORIADIS, I.H. SCHEINBERG
The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation
J. Biol. Chem. 246 (1971) 1461 - 1467
89. MUNTHE-KAAS, A.C., I. BERG, P.O. SØGLEN, R. SELJELID
Mass isolation and culture of rat Kupffer cells
J. exp. Med. 141 (1975) 1 - 10
90. MUNTHE-KAAS, A.C.
Phagocytosis in rat Kupffer cells in vitro
Exp. Cell. Res. 99 (1976) 319 - 327
91. MUNTHE-KAAS, A.C., G. KAPLAN, R. SELJELID
On the mechanism of internalization of opsonized particles by rat Kupffer cells in vitro
Exp. Cell. Res. 103 (1976) 201 - 212

92. MURPHY, J.R.
Influence of temperature and method of centrifugation
on the separation of erythrocytes
J. Lab. Clin. Med. 82 (1973) 334 - 341
93. NASH, G.R., S.J.WYARD
Erythrocyte membrane elasticity during in vivo ageing
Biochim. Biophys. Acta 643 (1981) 269 - 275
94. PERRET, G., D.BLADIER, L.GATTEGNO, P.CORNILLOT
The role of T-agglutinin in the disappearance of ery-
throcytes artificially aged by desialylation
Mech. Age. Dev. 12 (1980) 53 - 63
95. PERRET, G., D.BLADIER, L.GATTEGNO, P.CORNILLOT
The role of T-agglutinin in the disappearance of ery-
throcytes artificially aged by desialylation
Mech. Age. Dev. 12 (1980) 53 - 63
96. PFANNSCHMIDT, G., R.SCHAUER
The role of membrane sialyl and galactosyl residues in
regulation of the life-time of rabbit erythrocytes
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 361 (1980) 1683-1695
97. PLATT, D.
Biologie des Alterns
Quelle & Meyer, Heidelberg (1976) 67 - 71
98. PLATT, D., K.-H.HOFMANN, Th.VÖMEL
Untersuchungen mit ^{59}Fe zur Frage der Lebensdauer
von Kaninchen-Erythrozyten
Z. Geront. 12 (1979) 60 - 72
99. PLATT, D., P.NORWIG
Biochemical studies of membrane glycoproteins during
red cell ageing
Mech. Age. Dev. 14 (1980) 119 - 126
100. POWERS, H.J., D.I.THURNAM
Is red blood cell survival limited by the activity
of a critical enzyme?
J. Theor. Biol. 88 (1981) 685 - 691

101. RICK, W.
Klinische Chemie und Mikroskopie
Springer-Verlag, Berlin (⁵1977)
102. ROOS, E., K.P. DINGEMANS
Phagocytosis of tumor cells by murine Kupffer cells
in vivo and in the perfused mouse liver
In: The macrophage and cancer, eds. K. James, B. Mc.
Bride, A. Stuart, Econoprint, Edinburgh (1977) 216-224
103. SABA, T.M., N.R. DI LUZIO
Surgical stress and reticuloendothelial function
Surgery 65 (1969) 802 - 807
104. SABA, T.M.
Physiology and physiopathology of the reticuloendothe-
lial system
Arch. Intern. Med. 126 (1970) 1031 - 1052
105. SCHAUM'S Outline Statistic, hrsg. von M.R. Spiegel
McGraw-Hill Book Company GmbH, Düsseldorf, Auckland etc.
1976
106. SCHIMASSEK, H.
Regulation of lactate and pyruvate levels in perfusion
medium by the isolated rat liver
Life Sciences 11 (1962) 635 - 638
107. SCHIMASSEK, H.
Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels der isoliert
perfundierten Rattenleber
Biochem. Z. 336 (1963) 460 - 467
108. SCHIMASSEK, H.
Der Einfluß der Leber auf den extracellulären Redox-
Quotienten Lactat/Pyruvat
Biochem. Z. 336 (1963) 468 - 473
109. SCHIMASSEK, H.
Möglichkeiten und Grenzen der Methodik
In: 121, 1 -10

110. SCHIMASSEK, H.
Wechselspiel zwischen Leberfunktion und Bluts substraten
In: 121. 109 - 117
111. SCHMIDT, R.F., G.THEWS (Hrsg.)
Physiologie des Menschen
Springer-Verlag, Berlin (1977)
112. SCHMIDT, E.
Austritt von Zell-Enzymen aus der isolierten, perfundierten Rattenleber
In: 121. 53 - 66
113. SCHMUCKER, D.L., J.C.CURTIS
A correlated study of the fine structure and physiology of the perfused rat liver
Lab. Invest. 30 (1974) 201 - 212
114. SCHMUCKER, D.L., A.L.JONES, Ch.E.MICHELSSEN
An improved system for hemoqlobin-free perfusion of isolated rat livers
Lab. Invest. 33 (1975) 168 - 175
115. SCHOLZ, R.
Untersuchung zur Redoxkompartimentierung bei der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber
In: 121. 25 - 52
116. SEAMAN, G.V.F., R.J.KNOX, F.J.NORDT, D.H.REGAN
Red cell aging. Surface charge density and sialic acid content of density-fractionated human erythrocytes
Blood 50 (1977) 1001 - 1011
117. SHATTIL, S.J., R.A.COOPER
Maturation of macroreticulocyte membranes in vivo
J. Lab. Clin. Med. 79 (1972) 215 - 227
118. SHIGA, I., N.MAFUDA, T.SUDA, K.KON, M.SEKIYA
The decreased membrane fluidity of in vivo aged, human erythrocytes. A spin label study.
Biochim. Biophys. Acta 553 (1979) 84 - 95

119. SIEGENTHALER, W. (Hrsg.)
Klinische Pathophysiologie
Thieme Verlag, Stuttgart (4 1979)
120. SKUTELSKY, E., R. LOTAN, N. SHARON, D. DANON
Distribution of the T-antigen on erythroid cell surfaces.
Studies with peanut agglutinin, an anti-T specific lectin
Biochim. Biophys. Acta 467 (1977) 165 - 174
121. STAIB, W., R. SCHÖLZ (Hrsg.)
Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber
Springer-Verlag, Berlin 1968
122. TABAK, C., J. EUGENE, E. A. STEMMER
Erythrocyte survival following extracorporeal circulation
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 81 (1981) 30 - 33
123. TANNERT, C., A. STEINHOFF, T. RAPOPORT, R. ELSNER,
S. M. RAPOPORT
ATP-abhängige und ATP-unabhängige Veränderungen der
Deformierbarkeit von Humanerythrozyten
Acta Biol. Med. Germ. 39 (1980) 199 - 205
124. TATSUMI, N.
The size of erythrocyte ghosts
Biochim. Biophys. Acta 641 (1981) 276 - 280
125. TRAUTSCH, Ch., C. TANNERT, D. MARETZKY
Disproportional loss of membrane constituents in the
course of erythrocyte ageing
Acta Biol. Med. Germ. 40 (1981) 743 - 746
126. VAUGHAN, R. B.
Interactions of macrophages and erythrocytes: Some
further experiments
Immunology 8 (1965) 245 - 250
127. VÖMEL, Th., D. PLATT, W. STROBELT
Diameters of erythrocytes of different ages measured
by scanning electron-microscopy
Mech. Age. Dev. 13 (1980) 357 - 365

128. VÖMEL, Th.
Institut für Gerontologie, Universität Erlangen-
Nürnberg, Unveröffentlichte Ergebnisse
129. VÖMEL, Th., D. PLATT, B. SCHNORR
Untersuchungen zur Phagozytose-Aktivität der isoliert
perfundierten Leber unterschiedlich alter Ratten
Fortschritte der Medizin 99 (1981) 1511 - 1515
130. VOLKMAN, A.
Disparity in origin of mononuclear phagocyte populations
J. Reticuloend. Soc. 19 (1976) 249 - 268
131. WALTER, H., F.W. SELBY
Counter-current distribution of red blood cells of
slightly different ages
Biochim. Biophys. Acta 112 (1966) 146 - 153
132. WALTER, H., F.W. SELBY, R. GARZA
On the counter-current distribution by red blood
cells: An addendum
Biochim. Biophys. Acta 136 (1967) 148 - 150
133. WARD, L.C., P.J. BUTTFRY
The patho-physiological basis for tests of viability
in isolated perfused organs
Biomedicine 30 (1979) 181 - 186
134. WEED, R.I., L. WEISS
The relationship of red cell fragmentation occurring
within the spleen to cell destruction
Trans. Ass. Amer. Physicians 79 (1966) 426 - 438
135. WEED, R.I.
The importance of erythrocyte deformability
Am. J. Med. 49 (1970) 147 - 150
136. WEIR, D.M., F. GLASS, J. STEWART
Recognition, adherence and phagocytosis
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 132 (1981) 131 - 149

137. WILLIAMS, A.R., D.R. MORRIS
The internal viscosity of the human erythrocyte may
determine its lifespan in vivo
Scand. J. Haematol. 24 (1980) 57 - 62
138. WILLIAMSON, D.H., J. MELLANBY
D-(-)-3-Hydroxybutyrate
In: 15, 1772 - 1775
139. WINTERBOURN, C.C., R.D. BATT
Lipid composition of human red cells of different
ages
Biochim. Biophys. Acta 202 (1970) 1 - 8
140. YAARI, A.
Mobility of human red blood cells of different age
groups in an electric field
Blood 33 (1969) 159 - 163
141. YOUNG, M.K., J.F. PRUDDEN, J.A. STIRMAN
A perfusion technique for the study of liver metabolism
J. Lab. Clin. Med. 46 (1955) 155 - 166

Ich danke Herrn Professor Dr. D. Platt für die Möglichkeit, meine Arbeit im Institut für Gerontologie angefertigt haben zu dürfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. T. Vömel für die Überlassung des Themas, die Anregungen und die großzügige, freundliche Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. B. Schnorr danke ich für die Ausführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Den Mitarbeitern am Institut für Gerontologie, besonders aber Frau Schmidt, danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre.

Lebenslauf

Am 23. Juni 1965 wurde ich, Klaus Hager, als Sohn des Porzellanmalers Erich Hager und seiner Frau Gerda, geb. Möckel in Selb geboren.

Die Schulausbildung in meiner Heimatstadt, vier Jahre Volksschule von 1961 - 65 und neun Jahre am städtischen Gymnasium schloß ich 1974 mit der Reifeprüfung ab.

Danach trat ich für zwei Jahre in den Dienst der Bundeswehr.

Im Herbst 1976 begann mein Studium der Medizin in Erlangen, absolvierte dort im September 1978 die Ärztliche Vorprüfung und verbrachte anschließend einen einjährigen Studienaufenthalt in Rennes (Frankreich). Nach der Rückkunft setzte ich die Ausbildung an der Universität Erlangen fort.

Im September 1982 heiratete ich meine Frau Irmgard.

Im April 1983 endete das Studium mit der Ärztlichen Prüfung und der Zuteilung der Approbation.

Klaus Hager

